



HAL
open science

Etude du stress oxydatif dans l'hypertrophie bénigne de la prostate et mise en évidence de l'effet de la propolis contre le cancer de la prostate in vivo sur un modèle animal de rat Wistar et ex vivo sur les cellules LNCaP du cancer de la prostate hormono-sensibles

Nada Zabaïou

► To cite this version:

Nada Zabaïou. Etude du stress oxydatif dans l'hypertrophie bénigne de la prostate et mise en évidence de l'effet de la propolis contre le cancer de la prostate in vivo sur un modèle animal de rat Wistar et ex vivo sur les cellules LNCaP du cancer de la prostate hormono-sensibles. Biologie moléculaire. Université Clermont Auvergne [2017-2020]; Université de Jijel, 2017. Français. NNT : 2017CLFAC102 . tel-01930319

HAL Id: tel-01930319

<https://theses.hal.science/tel-01930319>

Submitted on 21 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel
Faculté de sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية



Université Clermont Auvergne

UFR Sciences et Technologies

Ecole Doctorale des Sciences
de la Vie, Santé, Agronomie et
Environnement



Thèse en Co-Tutelle

Présentée par

Mlle Nada ZABAIYOU

En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : BIOLOGIE

Option : Toxicologie Moléculaire

*Etude du stress oxydatif dans l'hypertrophie bénigne de la prostate
et mise en évidence de l'effet de la propolis contre le cancer de la
prostate in vivo sur un modèle animal de rat Wistar et ex vivo sur les
cellules LNCaP du cancer de la prostate hormono-sensibles.*

Soutenue publiquement le : 23 /10 / 2017

Membres du jury :

Président : Pr. Hocine RECHRECHE, Université MSB de Jijel (Algérie)

Directeur de Thèse Algérien : Pr. Mesbah LAHOUEL, Université MSB de Jijel (Algérie)

Directeur de Thèse Français : Pr. Jean-Marc A. LOBACCARO, Université Clermont Auvergne (France)

Examineur : Dr. Maamâr SOUIDI, IRSN, Fontenay-aux-Roses (France)

Examineur : Pr. Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ, Université Clermont Auvergne (France)

Examineur : Pr. Dalila NAÏMI, Ecole Nationale de Biotechnologie de Constantine (Algérie)

DÉDICACES

A ma maman et mon papa

A mes chères sœurs Soumia, Houda (et son époux Hamza) et la petite adorable Lyna

A mon cher frère Allaoua

A mes grand-mères et à toute la famille

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mes deux directeurs de thèse : Monsieur le Docteur Mesbah LAHOUEL, professeur à l'Université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel (Algérie) et Monsieur le Docteur Jean Marc LOBACCARO, professeur à l'Université Clermont Auvergne (France), pour leur compétence, rigueur scientifique, disponibilité et clairvoyance et pour les multiples conseils et toutes les heures qu'ils m'ont consacré à diriger cette recherche. Jean Marc, merci de m'avoir accueilli au sein de ton équipe. J'ai été extrêmement sensible à tes qualités humaines d'écoute et de compréhension et pour m'avoir ouvert les portes à la recherche.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury : Monsieur le Docteur Hocine RECHRECHE, Professeur à l'Université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel (Algérie), Monsieur le Docteur Maamâr SOUIDI, chercheur à IRSN, Fontenay-aux-Roses (France), Madame le Docteur Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ, Professeur à l'Université Clermont Auvergne (France) et Madame le Docteur Dalila NAÏMI, Professeur à l'Ecole Nationale de Biotechnologie de Constantine (Algérie), pour avoir accepté de jurer mon travail. Veuillez trouver en ce travail l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie tous les membres de l'équipe LXR, Amalia, Silvère, David, Manue, Aurélie, Lauriane, Betty, Anthony, Laura, Guy, Salwane, Arnaud, Laurent, Claude et Cyrille. Le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler et les discussions que j'ai pu avoir durant les réunions d'équipe ou en dehors m'ont beaucoup apporté. Un grand merci aussi à tous les membres du Laboratoire GReD Campus des Cézeaux pour leur accueil et leur disponibilité.

J'exprime tous mes remerciements à Noudjoud et Yahia pour leur aide et disponibilité au sein du laboratoire LTM à Jijel. Je remercie également Jean Paul SARU pour toutes ses explications et son aide concernant le western blot, Angélique DE HAZE pour sa disponibilité et surtout sa gentillesse et son sourire permanent et Cristelle SOUBEYRAND-DAMON pour tout son aide en histologie et en microscopie.

Je tiens à remercier également Allan pour sa disponibilité et pour m'avoir appris beaucoup de techniques.

Un grand merci à la famille LOBACCARO pour tous les moments agréables que j'ai passés avec eux.

Je remercie chaleureusement mes amies Fatiha, Houda, Kissi, Allison et Amandine pour m'avoir soutenues, aidées et être à mes côtés et pour les moments de folie qu'on a passés ensemble. Sans oublier mes chères amies Meriem, Safia et Dalila que j'aime beaucoup ainsi que Ahmed ben, Fatima benti et Layal pour leur amitié et leur attention.

Je ne saurais terminer sans remercier mes chers parents, sources de mes joies, secret de ma force, pour leurs sacrifices, leur amour et tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études. C'est à vous que je dois cette réussite et je suis fière de vous l'offrir.

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, mes sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce travail.

Sommaire

Introduction	02
Rappels bibliographiques	04
I. La prostate	05
I.1. Fonction	05
I.2. Anatomie et histologie	06
I.3. L'épithélium prostatique	07
I.4. Pathologies prostatiques	08
I.4.1. Prostatite	08
I.4.1.1. Facteurs de risque et traitement	08
I.4.2. Hypertrophie bénigne de la prostate	09
I.4.2.1. Facteurs de risque	10
I.4.2.2. Traitements de l'HBP	11
I.4.3. Cancer de la prostate	11
I.4.3.1. Physiopathologie et modifications moléculaires au cours du cancer de la prostate	12
I.4.3.2. Rôle de l'apoptose dans la carcinogenèse prostatique	16
I.4.3.3. Rôle du stress oxydatif	17
I.4.3.4. Le récepteur des androgènes	20
I.4.3.4.1. Les ligands de AR	21
I.4.3.4.2. Rôle de AR dans le cancer de la prostate	22
I.4.3.5. Manifestations cliniques et diagnostic	23
I.4.3.6. Traitement du cancer de la prostate	24

I.4.3.7. Les modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> du cancer de la prostate	26
I.4.3.7.1. Les lignées cellulaires	26
a. Cellules DU-145	27
b. Cellules PC-3	27
c. Cellules LNCaP	27
I.4.3.7.2. Les modèles animaux	28
a. Les souris porteuses de xénogreffes	28
b. Les souris transgéniques (génétiquement modifiées)	28
c. Les souris allogreffes	28
d. Les souris <i>knockout</i> (KO)	29
II. Le benzo(a)pyrène dans la prostate	30
II.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	30
II.2. Benzo(a)pyrène [B(a)P]	31
II.3. Exposition de la population générale	32
II.4. Toxicité du B(a)P	32
II.5. Toxicocinétique du B(a)P	33
II.5.1. L'absorption	33
II.5.2. La distribution	34
II.5.3. La biotransformation	34
II.5.3.1. Voie des diol-époxydes	35
II.5.3.2. Voie du cation radicalaire	36
II.5.3.3. Voie des quinones/espèces réactives de l'oxygène	36
II.5.3.4. Mécanisme à travers le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR)	38

II.5.4. Conjugaison et élimination du B(a)P	40
II.5.5. Exposition au B(a)P et risque du cancer de la prostate	41
III. La propolis	42
III.1. Introduction	42
III.2. Composition brute de la propolis	43
III.3. Propriétés biologiques de la propolis	44
III.3.1. Modulation du système immunitaire	46
III.3.2. Effet antibactérien et antifongique	46
III.3.3. Effet antioxydant	47
III.3.4. Effet antiprolifératif	48
III.3.4.1. Effet de la propolis sur le cancer de la prostate	49
III.4. Utilisation de la propolis comme adjuvant dans la thérapie du cancer	51
Partie expérimentale	53
I. Le stress oxydatif dans l'hypertrophie bénigne de la prostate	54
I.1. Matériels et Méthodes	55
I.1.1. Etude clinique	55
I.1.2. Etude <i>in vivo</i>	55
I.1.2.1. Entretien des animaux et induction de l'HBP	55
I.1.2.2. Extraction de la fraction cytosolique	56
I.1.2.3. Dosage du glutathion (GSH)	56
I.1.2.4. Dosage du MDA	56
I.1.2.5. Evaluation des activités enzymatiques antioxydantes	56
a. Activité de la superoxyde dismutase (SOD)	56

b. Activité de la glutathion S-transférase (GST)	57
I.2. Résultats	57
I.2.1. Etude clinique	57
I.2.1.1. Variation des taux du MDA cytosolique	58
I.2.1.2. Variation des taux du GSH cytosolique	58
I.2.1.3. Variation des activités enzymatiques antioxydantes	59
I.2.2. Etude <i>in vivo</i>	60
I.2.2.1. Développement de l'HBP chez le rat Wistar	60
I.2.2.2. Variations des taux du MDA cytosolique	61
I.2.2.3. Variations des niveaux du GSH cytosolique	62
I.2.2.4. Variations de l'activité enzymatique antioxydante au cours du développement de l'HBP	63
I.3. Discussion	64
I.4. Conclusion	66
II. La propolis réduit la prolifération des cellules du cancer de la prostate induit par le benzo(a)pyrène chez les rats Wistar	67
II.1. Matériels et méthodes	67
II.1.1. Animaux	67
II.1.2. Traitement des animaux	67
II.1.3. Extraction et préparation de la propolis	68
II.1.4. Sacrifice des animaux	68
II.1.5. Etude histologique	68
II.1.5.1. Préparation des blocs de paraffine	68
II.1.5.2. Coloration Hématoxyline/Eosine	69

II.1.5.3. Immunohistochimie	69
II.1.6. Extraction des protéines	69
II.1.7. Analyse par <i>western blot</i>	69
II.1.8. Extraction des ARN	70
II.1.9. RT-qPCR	70
II.1.10. Analyse statistique	71
II.2. Résultats	71
II.2.1. Modifications histologiques du tissu prostatique induites par le B(a)P	71
II.2.2. Effet du B(a)P sur la prolifération cellulaire (Indice de prolifération Ki-67)	73
II.2.3. Augmentation de l'accumulation de AR dans la prostate au cours de la carcinogenèse induite par le B(a)P	74
II.2.4. Augmentation de l'expression de AhR dans la prostate au cours de la carcinogenèse induite par le B(a)P	76
II.2.5. Induction du cytochrome CYP1A1	77
II.2.6. La propolis diminue la croissance des cellules prostatiques	77
II.2.7. La propolis module l'expression de AhR	79
II.3. Discussion	80
II.4. Conclusion	84
III. La propolis possède une activité antagoniste de AR et affecte la survie d'une lignée de cellules de cancer de la prostate	85
III.1. Matériels et Méthodes	85
III.1.1. Culture cellulaire	85
III.1.2. Préparation de l'extrait de propolis	86
III.1.3. Test de prolifération cellulaire MTT	86

III.1.4. Analyse par <i>western blot</i>	86
III.1.5. Extraction des ARN et analyse par RT-qPCR	87
III.1.6. Cyométrie en flux	88
III.1.7. Test du gène rapporteur de la luciférase	88
III.1.8. Etude statistique	88
III.2. Résultats	89
III.2.1. L'extrait de propolis diminue la prolifération cellulaire des cellules LNCaP	89
III.2.2. La propolis induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules LNCaP	89
III.2.3. La propolis diminue l'accumulation de AR et de son gène cible PSA	90
III.2.4. La propolis diminue l'expression des gènes cibles de AR	91
III.2.5. La propolis est un antagoniste de AR	92
III.3. Discussion	94
III.4. Conclusion	97
Conclusion et perspectives	99
Annexe 1	102
Annexe 2	112
Références bibliographiques	118

Liste des figures

Fig.1 Système reproductif masculin	05
Fig.2 Représentations schématiques de l'anatomie de la prostate	06
Fig.3 Mécanisme de la régulation négative de Pten dans l'oncogenèse prostatique	13
Fig.4 Implication de la voie wnt dans le cancer de la prostate	14
Fig.5 Activation des voies de signalisation JAK/STAT et MAPK au cours de la carcinogenèse prostatique	16
Fig.6 Schéma représentatif de la famille des Bcl2 avec ses 3 sous-groupes	17
Fig.7 Structure chimique de quelques HAP	31
Fig.8 (A) Métabolisme du B(a)P en diolépoxydes. (B) Interaction du (+)trans BPDE avec l'ADN et formation de l'adduit (+)-trans anti-BPDE-N2-dG-ADN	35
Fig.9 Cycle redox de la formation benzo(a)pyrène-1,6-quinone	37
Fig.10 Mécanisme d'activation du récepteur AhR par le B(a)P	39
Fig.11 Collecte et fabrication de la propolis par les ouvrières butineuses	42
Fig.12 Structure chimique des molécules citées entrant dans la composition des différentes propolis	44
Fig.13 Représentation schématique des activités de la propolis	47
Fig.14 Variations des niveaux cytosoliques du MDA	58
Fig.15 Variations des niveaux cytosoliques du glutathion	59
Fig.16 Variations des activités enzymatiques des enzymes antioxydantes	60
Fig.17 Modifications histologiques de la prostate ventrale induites par l'administration de la testostérone chez le rat Wistar	61
Fig.18 Variations des taux du MDA cytosolique dans les différents groupes de rats	62

Fig.19 Variations des taux du GSH cytosolique dans les différents groupes de rats	62
Fig.20 Variations des activités enzymatiques de la SOD et de la GST dans les différents groupes de rats	63
Fig.21 Modifications histologiques au cours du développement de l'adénocarcinome prostatique induit par le B(a)P	72
Fig.22 Expression du Ki-67 dans le tissu prostatique	74
Fig.23 Expression de AR dans le tissu prostatique	75
Fig.24 Expression relative des niveaux des ARNm de AhR dans le tissu prostatique mesurée par RT-qPCR (A). Représentation des niveaux protéiques relatifs de AhR dans le tissu prostatique mesurés par western blot (B)	76
Fig.25 Expression relative des niveaux des ARNm de CYP1A1 dans le tissu prostatique mesurée par RT-qPCR (A). Représentation des niveaux protéiques relatifs de CYP1A1 dans le tissu prostatique mesurés par western blot (B)	77
Fig.26 Expression du Ki-67 dans le tissu prostatique	78
Fig.27 Expression de AhR dans le tissu protatique	80
Fig.28 Effet de l'extrait de propolis sur la survie cellulaire des cellules LNCaP	89
Fig.29 L'extrait de propolis à 0,04 mg/ml (IC50) induit l'apoptose par l'augmentation des niveaux de cPARP (A) et régule le cycle cellulaire des cellules LNCaP (B)	90
Fig.30 Effet de l'extrait de propolis (0,04 mg/ml) sur l'accumulation du récepteur des androgènes (AR) (A) et les concentrations de PSA dans le milieu de culture (B) sur les cellules LNCaP	91
Fig.31 La propolis module les effets des androgènes sur leurs gènes cibles SGK1 et FKBP5	92
Fig.32 Activité luciférase d'un gène rapporteur contenant un ARE-tk luc co-transfecté avec AR dans les cellules Hela	93

Liste des abréviations

ADT	Androgen Deprivation Therapy
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
Akt	Protein kinase B (PKB)
AP-1	Activator Protein 1
Apc	Adenomatous Polyposis Coli
AR	Androgen Receptor
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CAT	Catalase
CD57	Cluster of Differentiation 57
CRPC	Castration-resistant prostate cancer
DHT	Dihydrotestosterone
EGF	Epidermal Growth Factor
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transférase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HBP	Hypertrophie Bénigne de la Prostate
HPIN	High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia

Hsp	Heat Shoc Protein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
JAK/STAT	Janus kinases/ signal transducers and activators of transcription
KO	Knockout
LBD	Ligand Binding Domain
LH	Luteinizing Hormone
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDA	Malondialdehyde
MMP	Matrix Metalloproteinase
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK	NF κ B inducing Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase
PIN	Prostatic Intraepithelial Neoplasia
PIP	Phosphatidylinositol Phosphate
PSA	Prostate Specific Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Rb	Retinoblastoma
RNS	Reactive Nitrogen Species

SOD	Superoxyde Dismutase
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
UGT	UDP-glucuronyltransférases
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

Introduction

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) ou adénome prostatique est un trouble fréquent caractérisé cliniquement par un agrandissement de la prostate et des symptômes obstructifs (Yang et al., 2003). Elle est due à la croissance excessive des cellules stromales et épithéliales de la prostate. On estime que 50 % des hommes âgés de plus de 50 ans et 90 % des hommes à l'âge de 80 ans auront une HBP (Espinosa et al., 2013).

L'étiologie et la pathogenèse de l'HBP ne sont pas bien comprises. Plusieurs paramètres incluant l'inflammation, les hormones et les facteurs diététiques sont considérés comme jouant un rôle dans le développement de l'HBP (Minciullo et al., 2015).

Le stress oxydatif survient suite à la présence d'un déséquilibre entre la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et la capacité des systèmes biologiques à réparer les dommages oxydatifs ou neutraliser les effets des intermédiaires réactifs formés incluant les peroxydes et les radicaux libres. L'augmentation de la production des EOR et la diminution de l'efficacité des mécanismes de défense antioxydants conduisent à des dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN (Udensi et Tchounwou, 2016). Le stress oxydatif et la génération des espèces oxygénées réactives (EOR), causeraient également divers dommages et perturbations moléculaires et cellulaires dans plusieurs maladies humaines (Savas, 2012) et plusieurs études ont abordé la relation entre le développement de l'HBP et le stress oxydatif.

Le cancer de la prostate est une maladie très hétérogène, en termes de sa pathologie et de sa présentation clinique (Reynolds, 2008). Sa fréquence varie largement, entre les plus hautes fréquences enregistrées dans les pays occidentaux et les faibles fréquences dans les pays asiatiques. Plusieurs facteurs contribuent à l'élévation de l'incidence et de la prévalence du cancer de la prostate. Les facteurs de risque comprennent l'âge, l'histoire familiale et la race mais aussi l'alimentation riche en gras et l'obésité (Benedettini et al., 2008).

Le cancer de la prostate localisé peut être efficacement traité par chirurgie ou par radiothérapie. Pour les cancers les plus avancés, la déprivation androgénique visant à bloquer la signalisation du récepteur des androgènes AR est un traitement initial très efficace. Malheureusement, après peu de temps, le cancer indépendant des androgènes, très agressif et réfractaire aux thérapies hormonales conventionnelles, se développe (Devlin et Mudryj,

2009). Il est donc indispensable de chercher de nouvelles molécules qui soient plus efficaces, plus résistantes et à moindre effets indésirables.

La propolis est un matériau collant et coloré produit par les abeilles à partir des bourgeons, feuilles et de l'écorce de plusieurs espèces végétales. Une fois collecté, ce matériau est enrichi en sécrétions enzymatiques et salivaires (Pellati et al., 2011). Les abeilles l'utilisent pour sceller les fissures de la ruche et surtout comme antiseptique pour éviter les contaminations des colonies (Huang et al., 2014).

La composition chimique de la propolis est complexe et change en fonction de la végétation utilisée par les abeilles ainsi, par l'espèce des abeilles ainsi que selon les régions et les saisons (Zabaiou et al., 2017). Les constituants majeurs de la propolis produite dans les zones tempérées sont les composés phénoliques. Ces composés ont été largement étudiés surtout pour leur richesse en antioxydants. Ils sont capables de prévenir la formation des radicaux libres (Zabaiou et al., 2017).

Plusieurs effets pharmacologiques ont été attribués à la propolis, comme l'effet antibactérien, antiparasitaire, antioxydant et antiprolifératif. A Jijel, la propolis a été étudiée pour ses effets antioxydants, antibactérien et antiprolifératif contre le mélanome (Benguedouar et al., 2016) mais jamais contre le carcinome prostatique.

L'objectif de notre étude est de :

1) Etudier l'effet du stress oxydatif sur le développement de l'hypertrophie bénigne de la prostate. Ceci a été réalisé par une étude clinique sur des pièces opératoires obtenues à partir de malades développant une HBP, et par une étude *in vivo*, sur des rats Wistar auxquels nous avons administré de la testostérone afin de développer une HBP. Le stress oxydatif a été évalué en mesurant les taux cytosoliques du glutathion et du MDA et les activités enzymatiques des enzymes antioxydantes cytosoliques.

2) Etudier l'effet de la propolis sur le développement du cancer de la prostate :

- Par une étude expérimentale sur un modèle de cancer de la prostate développé chez le rat Wistar par l'administration d'une molécule appartenant à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui est le benzo(a)pyrène [B(a)P].
- Par une étude *in vitro* sur les cellules LNCaP du cancer de la prostate hormono-dépendant.

Rappels
bibliographiques

I. La prostate

I.1. Fonction

La prostate est une glande de l'appareil urogénital masculin, développée autour de la portion initiale de l'urètre, au carrefour des voies urinaires et des voies spermatiques (Figure 1). Elle mesure environ 30 mm de hauteur, 20 mm de largeur et 25 mm d'épaisseur en moyenne et pèse entre 15 et 25 grammes à l'âge adulte et lorsqu'elle est saine. Très petite à la naissance, elle augmente de volume au moment de la puberté, puis de nouveau après 50 ans. Elle est impliquée à la fois dans la miction, la fertilité et l'éjaculation (Verze et al., 2016).

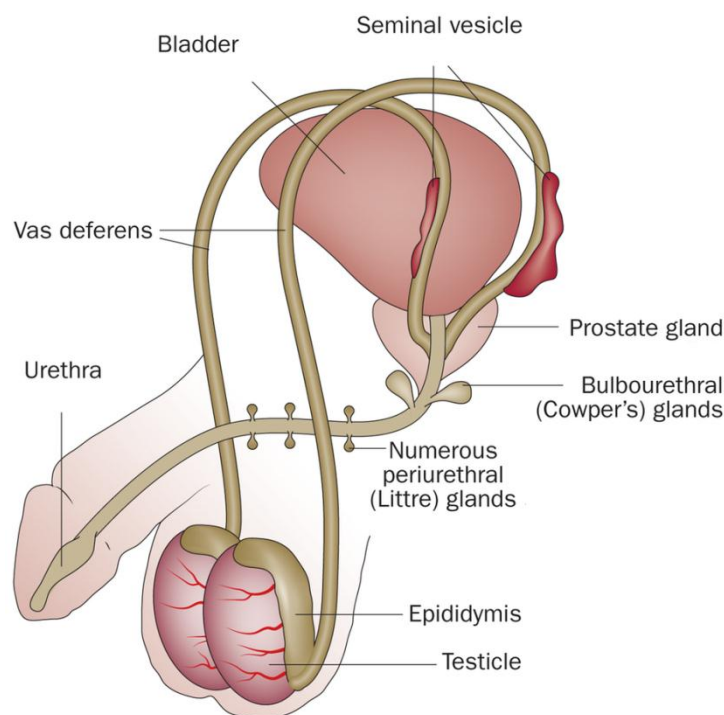


Fig.1 Système reproductif masculin (Drabovich et al., 2014).

Les sécrétions prostatiques participent à la formation du sperme et constituent 30 % du volume du liquide séminal. Celui-ci est essentiellement produit par les vésicules séminales, les glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper) et la prostate. Les canaux déférents provenant des testicules acheminent les spermatozoïdes jusqu'à la prostate. Le mélange de ceux-ci avec le liquide séminal constitue le sperme (McNeal, 1988).

I.2. Anatomie et histologie

L'organisation anatomique de la prostate a fait l'objet de nombreuses études au cours du siècle dernier. Après la description des lobes prostatiques par Lowsley et al. en 1915, le modèle anatomique actuellement accepté est celui proposé par McNeal en 1981.

Chez l'homme, trois zones anatomiques et fonctionnelles ont été définies :

1-La zone périphérique constitue plus de 70% de la prostate glandulaire. Elle forme un disque de tissu dont les canaux rayonnent latéralement de l'urètre latéral et distal au *colliculus* séminal (ou *veru montanum* en ancienne nomenclature). La très grande majorité (plus de 85%) des carcinomes se développent dans cette zone.

2- La zone centrale constitue 25% de la prostate glandulaire. Ses canaux se trouvent près des orifices du conduit éjaculatoire et suivent ces canaux et se ramifient latéralement près de la base de la prostate. Sa bordure latérale fusionne avec la bordure de la zone périphérique proximale, complétant en continuité avec la zone périphérique, un disque constitué de tissu sécréteur orienté dans un plan coronal. Elle est le siège de 5% des cancers.

3- Entre les deux se trouve la zone de transition (5% du volume prostatique glandulaire) qui contient les glandes dites mucosales. Elle est le site exclusif de l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), et le siège de 10% des cancers prostatiques.

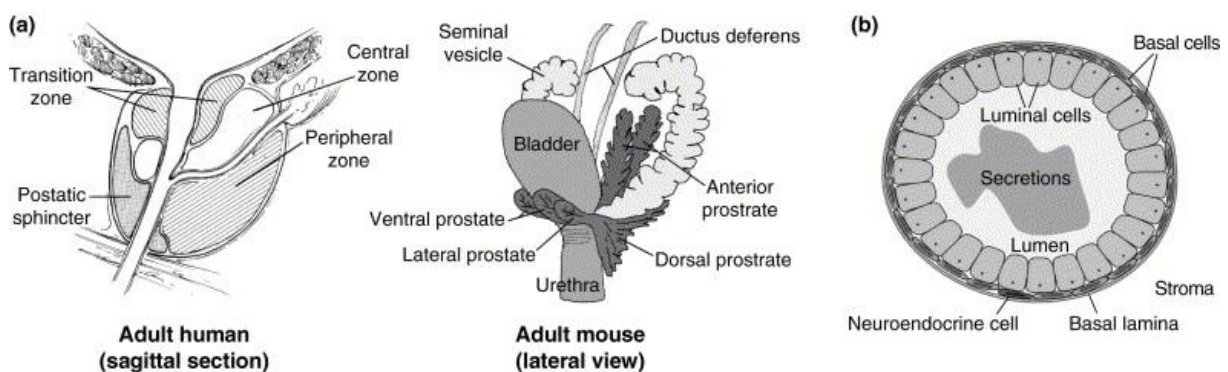


Fig.2 Représentations schématiques de l'anatomie de la prostate. (a) Comparaison schématique entre la prostate humaine (gauche) et la prostate de souris (La même chez le rat) (droite). (b) Représentation schématique des types de cellules dans une section transversale de l'épithélium prostatique (Abate-Shen et Shen, 2002).

Chez les rongeurs, à l'inverse, la prostate n'est pas constituée en une glande unique mais est séparée en 4 lobes doubles : antérieurs, dorsaux, latéraux et ventraux. Ces lobes sont disposés circonférentiellement autour de la vessie (Figure 2) et présentent des motifs caractéristiques de ramification canalaire et de production des protéines sécrétoires (Sugimura et al., 1986).

Même s'il n'existe pas une analogie claire entre la structure lobulaire de la prostate des rongeurs et l'architecture zonale de la prostate humaine, sur les bases anatomiques, pathologiques (Price, 1963) et moléculaires (Berquin et al., 2005), on considère que les lobes dorsolatéraux correspondent à la zone périphérique humaine, tandis que les lobes ventraux correspondent à la zone centrale.

I.3. L'épithélium prostatique

L'épithélium prostatique (Strand and Goldstein, 2015) est caractérisé par la présence de 3 types de cellules. Les plus abondantes sont les cellules luminales sécrétrices. Ce sont des cellules androgéno-dépendantes qui produisent les protéines sécrétoires prostatiques, notamment l'antigène spécifique de la prostate (PSA), la phosphatase acide spécifique de la prostate (PAP), les polyamines et les prostaglandines. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du récepteur aux androgènes (AR), de la cytokératine 8 et 18 et du marqueur de surface CD57 (Brawer et al., 1985; Nagle et al., 1987).

Le deuxième type cellulaire sont les cellules basales. Elles incluent des cellules souches qui donnent naissance à plusieurs sous populations de cellules progénitrices (Isaacs et Coffey, 1989). Ces cellules expriment la cytokératine 5 et 14 ainsi que le marqueur CD44. Elles sont caractérisées par une faible expression des androgènes et ne produisent pas les protéines sécrétoires prostatiques (Brawer et al., 1985; Nagle et al., 1987). Elles expriment aussi la GST π et le gène Bcl2 anti-apoptotique (Bui et Reiter 1998).

Le troisième type cellulaire sont les cellules neuroendocrines. Ce sont des cellules androgéno-indépendantes dispersées dans la membrane basale et qui expriment la chromogranine A, la sérotonine ainsi que divers autres neuropeptides, dont le rôle est la régulation de la croissance, de la différenciation et de l'activité sécrétrice de l'épithélium prostatique (Abrahamsson, 1996).

I.4. Pathologies prostatiques

Trois pathologies prostatiques sont habituellement décrites : prostatite, hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) et cancer de la prostate (Simpson, 1997).

I.4.1. Prostatite

La prostatite est la maladie prostatique la plus fréquente chez les hommes de moins de 50 ans. Elle se réfère à l'inflammation du tissu prostatique et se divise en quatre catégories : a) la prostatite bactérienne aiguë ; b) la prostatite bactérienne chronique, une infection rare caractérisée par des infections fréquentes des voies urinaires ; c) le syndrome de la prostatite chronique caractérisée par une douleur pelvienne chronique ; d) la prostatite inflammatoire asymptomatique, caractérisée par une leucocytose et des cellules luttant contre l'infection dans le sperme. Ces cellules sont une source riche d'espèces oxygénées réactives (EOR) qui peuvent contribuer aux dommages de l'ADN des spermatozoïdes et à des infertilités (Gupta-Elera, 2012).

I.4.1.1. Facteurs de risque et traitement

Les entérobactéries particulièrement *E. coli* sont les agents pathogènes prédominants de la prostatite (aiguë et chronique), mais dans une moindre mesure, d'autres pathogènes sont également trouvés, comme *Pseudomonas aeruginosa* et entérocoques (Wagenlehner et Naber, 2006). La prostatite bactérienne aiguë est associée à une infection des voies urinaires et se caractérise par l'apparition des symptômes de l'infection des voies urinaires (fréquence et dysurie) et des symptômes prostatiques (douleur pénienne et périnéale et symptômes obstructifs), fièvre et troubles systémiques (Luzzi, 2010). La prostatite bactérienne chronique est rare; elle représente 5% ou moins de patients atteints de prostatite chronique et peut être associée à des calculs prostatiques (Luzzi, 2010).

Le traitement de la prostatite bactérienne aiguë est basé sur l'utilisation d'agents antimicrobiens administrés par voie intraveineuse comme les aminoglycosides en association avec l'ampicilline. Pour les cas non sévères, les patients peuvent être traités par un fluoroquinolone par voie orale. Un cathétérisme urétral à petit calibre à court terme est recommandé chez les patients souffrants de symptômes obstructifs sévères ou de rétention urinaire. L'hospitalisation est obligatoire en cas d'hyperpyrexie, de vomissements prolongés,

de déshydratation, de tachycardie et d'hypotension (Nickel, 2011). Pour la prostatite bactérienne chronique, les fluoroquinolones sont les agents antimicrobiens recommandés, et pour réduire le taux de récurrence élevé, la combinaison d'antimicrobiens et d'alpha-bloquants est considérée comme optionnelle (Nickel, 2011).

L'étiologie du syndrome de la prostatite chronique (ou syndrome de la douleur pelvienne chronique) reste insaisissable malgré des années d'études. Quelques facteurs peuvent être impliqués comme l'élévation des taux des cytokines comme l'interleukine-1 β et le TNF dans les sécrétions prostatiques, la présence d'anomalies cliniques et urodynamiques et des facteurs psychologiques comme la dépression. Aucun traitement efficace fiable n'a été identifié. Des mesures simples sont utiles notamment les bains chauds, l'entretien de l'hydratation et l'évitement des facteurs de provocation comme le cyclisme, l'alcool et la caféine. L'utilisation des analgésiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens est aussi parfois utile (Nickel, 2011).

I.4.2. Hypertrophie bénigne de la prostate

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est un diagnostic histologique associé à une prolifération non régulée du tissu conjonctif, du muscle lisse et de l'épithélium glandulaire au niveau de la zone de transition. Dans l'HBP, la prolifération cellulaire entraîne une augmentation du volume péri-urétrale de la prostate et une augmentation du tonus musculaire lisse. McNeal (McNeal, 1984) a décrit deux phases de progression de l'HBP. La première consiste en une augmentation des nodules hypertrophiques au niveau de la zone péri-urétrale et la deuxième, une augmentation significative de la taille des nodules glandulaires. C'est un processus pathologique lié à l'action de la dihydrotestostérone sur AR.

Chez les hommes âgés, un important processus de remodelage des tissus a lieu dans la prostate, en particulier dans la zone de transition. Une interférence dans l'équilibre des voies de signalisation et des facteurs de croissance interagissant se produit, et les interactions entre le stroma et l'épithélium engendrent une augmentation du volume de la prostate. Plus précisément, les modifications les plus significatives ont lieu dans les cellules basales, qui changent leur métabolisme intracellulaire et deviennent hypertrophiques. Le développement de l'HBP est également accompagné de la présence de corps amyloïdes et de calculs prostatiques. Ces éléments contiennent typiquement des sels de phosphate de calcium, de

magnésium, de potassium, de carbonate de calcium ou d'oxalate de calcium (Geramoutsos et al., 2004).

Etant donné que la croissance cellulaire est la conséquence soit d'une prolifération cellulaire accrue, soit d'une diminution ou une inhibition de la mort cellulaire, l'activité apoptotique a également été suggérée comme un cofacteur clé dans le développement et la progression de l'HBP. Bien que certains auteurs aient rapporté des niveaux similaires d'apoptose dans l'épithélium de l'HBP par rapport à l'épithélium normal, d'autres rapports plus récents ont indiqué qu'une régulation anormale de l'apoptose peut être associée à l'HBP (Thompson et Yang, 2000). Kyprianou et al. ont étudié l'expression relative de deux protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose de la prostate: TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*) et Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), un puissant gène anti-apoptotique (Kyprianou et al., 1996). L'augmentation de l'expression des Bcl-2 est alors impliquée dans la dérégulation de l'apoptose et entraîne un déséquilibre de la croissance en faveur de la prolifération.

L'HBP peut provoquer une compression physique de l'urètre et entraîner une obstruction de la vessie par deux mécanismes distincts : d'abord, une augmentation du volume de la prostate, appelée composante statique puis une augmentation du tonus stromal des muscles lisses, appelée composante dynamique (Patel et al., 2014).

I.4.2.1. Facteurs de risque

La prévalence de l'HBP augmente nettement avec l'âge et ceci a été montré par différentes études (Williams et al., 1999 ; Bosch et al., 2007 ; Loeb et al., 2009). Plusieurs études ont montré l'hétérogénéité géographique du volume de la prostate. Il a été observé que les volumes des prostates sont significativement inférieurs chez les hommes asiatiques par rapport aux populations occidentales (Jin et al., 1999).

Plusieurs données suggèrent aussi l'implication de facteurs génétiques dans la HBP. Les chercheurs ont estimé que 50 % des hommes âgés de moins de 60 ans avaient une forme héréditaire de la maladie (Sanda et al., 1994). Ce résultat et ceux d'autres études ont suggéré un mode de transmission héréditaire autosomique dominant.

D'autres facteurs jouent aussi un rôle comme, les hormones sexuelles stéroïdiennes, les syndromes métaboliques, l'obésité, l'activité physique, l'alimentation et l'inflammation, (Patel et al., 2014).

I.4.2.2. Traitements de l'HBP

Le choix de l'approche à utiliser pour traiter la HBP dépend d'un certain nombre de facteurs tels que l'âge, la taille de la prostate, le poids, le taux de PSA ainsi que la gravité des symptômes. Cependant, tant que les symptômes sont légers et n'affectent pas les activités quotidiennes, il est préférable d'attendre et de surveiller le malade. Des traitements pharmacologiques sont toutefois disponibles : inhibiteurs de 5 α -réductase de type 2 qui transforme la testostérone en DHT (*dihydrotestérone*) (Füllhase et Schneider, 2016) et inhibiteurs des récepteurs α 1-adrénrgiques impliqués dans la contraction musculaire lisse (Lepor et al., 2012). Lorsque les symptômes sont graves (rétention urinaire sévère), les interventions chirurgicales deviennent indispensables (Kapoor, 2012).

I.4.3. Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est une maladie de l'homme âgé (Jemal et al., 2011). Environ 85 % de tous les cas de cancer de la prostate sont diagnostiqués chez les hommes de plus de 65 ans (Tenke et al., 2007). La plupart des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes, partageant de nombreuses caractéristiques communes avec d'autres cancers épithéliaux tels que le cancer du sein et du côlon.

La carcinogenèse prostatique est caractérisée par la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses résultant d'une prolifération cellulaire incontrôlée et comporte plusieurs étapes caractérisées d'un point de vue anatomique et pathologique. La néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) implique le développement anormal des cellules épithéliales qui tapissent les structures glandulaires prostatiques. La PIN de bas grade est caractérisée par des cellules épithéliales irrégulières avec des noyaux hyperchromatiques et pléomorphes. La PIN de haut grade (HPIN) se caractérise par des niveaux plus élevés de ces anomalies.

Le carcinome prostatique se développe à partir des cellules épithéliales. La première phase de développement de l'adénocarcinome prostatique correspond à la forme localisée suivie d'une extension locale. L'épithélium prostatique subit plusieurs modifications qui conduisent à la formation d'un carcinome *in situ* qui devient par la suite plus agressif. Après avoir franchi la capsule prostatique, la tumeur s'étend dans la graisse péri-prostatique puis vers les vésicules séminales par contiguïté. Les sites métastatiques les plus fréquents sont ganglionnaires et osseux. L'extension ganglionnaire est d'abord pelvienne puis rétropéritonéale. Les atteintes osseuses touchent préférentiellement le bassin, le rachis, les côtes et le sternum. Le cancer de

la prostate métastatique provient de sous-clones rares qui atteignent un potentiel métastatique (Gundem et al., 2015 ; Hong et al., 2015).

L'étiologie du cancer de la prostate est peu connue. Des études épidémiologiques ont montré la contribution de plusieurs facteurs comme les facteurs diététiques et environnementaux, les facteurs héréditaires et la signalisation des récepteurs hormonaux stéroïdes (Abate-Shen et Shen, 2010).

La classification pathologique du cancer de la prostate est définie par le score de Gleason, qui est basé sur des critères morphologiques. Le score de Gleason est la principale méthode de classement des tissus du cancer de la prostate et le facteur pronostique le plus important dans le cancer de la prostate. Un score élevé de Gleason prédit une progression plus rapide et suggère que des traitements agressifs sont nécessaires. Cependant, le score de Gleason ne fournit pas d'information sur la sélection thérapeutique. En conséquence, les patients sont actuellement groupés par stade clinique ou état de traitement (par exemple, avec ou sans métastase osseuse, résistance au traitement par ablation par l'androgène ou non, avec ou sans chimiothérapie) (Kryvenko et Epstein, 2016).

I.4.3.1. Physiopathologie et modifications moléculaires au cours du cancer de la prostate

Le cancer primitif de la prostate présente relativement peu d'aberrations génomiques par rapport aux autres cancers. On estime que ~ 80% des cancers de la prostate contiennent plus d'un foyer de la maladie. Des études multiples ont montré l'existence de foyers hétérogènes de PIN dans la même prostate, associés à un carcinome avec des aberrations similaires (Ruijter et al., 1996 ; Boutros et al., 2015).

La voie de signalisation PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/ Protein kinase B*) augmente chez environ 50 % des malades. Ceci est dû à l'inactivation de la phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) responsable de la régulation négative de PI3K/Akt à travers la phosphorylation de PIP3 (*Phosphatidylinositol phosphate 3*) en PIP2 (*Phosphatidylinositol phosphate 2*) (Bostrom et al., 2015 ; Robinson et al., 2015) (Figure 3). PTEN joue un rôle crucial dans le développement et la progression du cancer de la prostate. Il est fréquemment inactivé dans les cancers primitifs de la prostate humaine et sa perte de fonction est constamment associée à des caractéristiques de maladie agressives, à la

progression du cancer et au développement du cancer résistant à la castration (Shen et al., 2010).

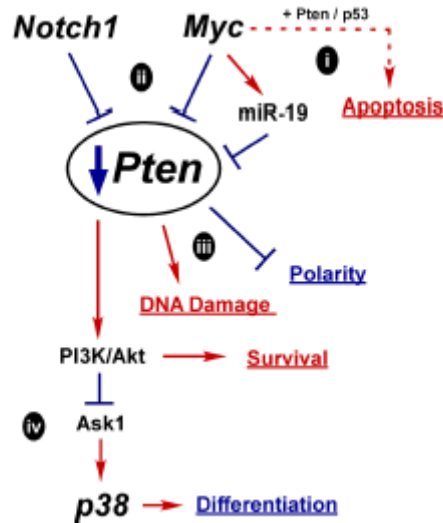


Fig.3 Mécanisme de la régulation négative de Pten dans l'oncogénèse prostatique (Frank et Miranti, 2013).

Une voie PI3K/Akt aberrante perturbe l'action de ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) favorisant ainsi la croissance tumorale AR-indépendante. Il est connu que Akt (*Protein kinase B*) peut phosphoryler AR directement et inhibe l'activation de ses gènes cibles. Inversement AR peut moduler la voie de signalisation PI3K/Akt (Baron et al., 2004). La voie PI3K/Akt peut aussi réguler la transcription de AR à travers des mécanismes autres que sa phosphorylation (Lee et al., 2015).

Dans les cellules tumorales prostatiques, le facteur NFκB (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) est stimulé grâce à une augmentation des niveaux de récepteurs comme TNF, qui augmente la dégradation de IκB (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*) (Such et al., 2002). Dans les cellules androgéno-indépendantes, l'expression de NFκB augmente au niveau transcriptionnel et protéique. Ceci est dû à l'augmentation de l'expression de IL-6 qui se produit suite à l'activation de NFκB par un signal de transduction via NIK (*NFκB inducing kinas*) et IKK (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*) (Xiao et al., 2004).

La progression du cancer de la prostate est souvent corrélée à la dérégulation de certains facteurs de croissance ainsi que de leurs voies de signalisation (Djakiew et al., 2010). L'augmentation des taux sériques de IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) est un indice de

cancer de la prostate et augmente le risque de malignité (Kojima et al., 2009). TGF β (*Transforming Growth Factor β*) augmente dans le sérum des malades atteints de cancer de la prostate et est associée aux métastases osseuses (Shariat et al., 2001). Il a été montré dans le cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC) une surexpression de EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF α (*Transforming Growth Factor α*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) et de leurs récepteurs (Neto et al., 2010).

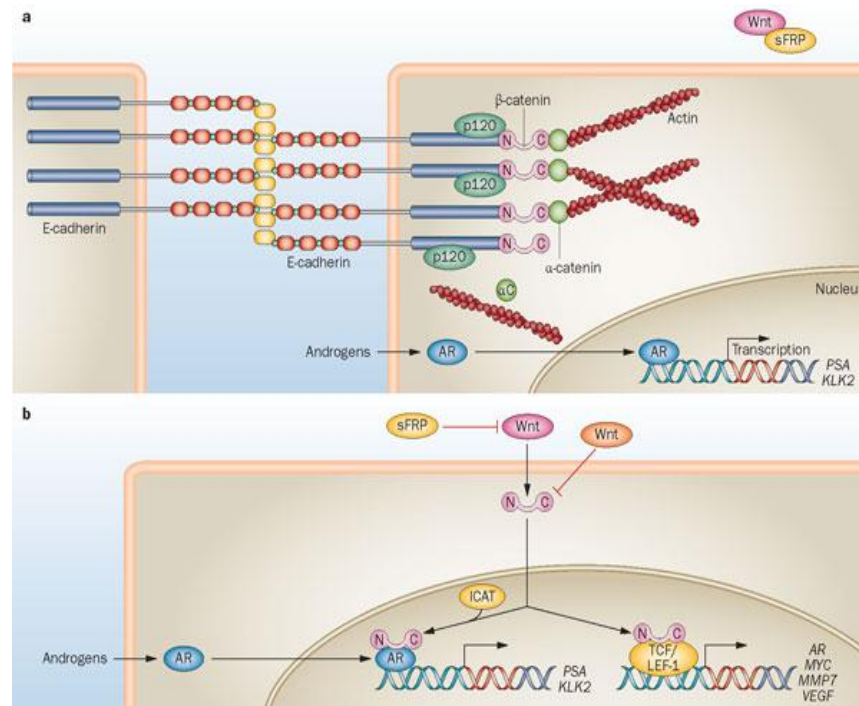


Fig.4 Implication de la voie wnt dans le cancer de la prostate. a) Dans les cellules épithéliales prostatiques normales, la β -caténine est probablement associée à des cadhérines au niveau des jonctions cellulaires. Les androgènes contrôlent l'expression des gènes cibles de AR nécessaires pour l'homéostasie de la prostate, comme le PSA et le KLK2. b) Dans le cancer de la prostate, l'augmentation de l'expression des Wnts canoniques, telles que Wnt-1 et Wnt-3a, augmente les niveaux de β -caténine. Le récepteur des androgènes activé par les androgènes et les protéines de la famille TCF / LEF-1 est en compétition pour la liaison à la β -caténine. La formation des complexes β -caténine-AR, conduisant à l'expression des gènes cibles de AR. L'absence d'androgènes favorise la formation de complexes de β -caténine-TCF et l'expression de gènes cibles β -caténine / TCF tels que AR, MYC, MMP7 et VEGF. Les Wnts non canoniques, tels que Wnt-5a et Wnt-11, et l'antagoniste de Wnt sFRP-1 peuvent inhiber ces activités médiées par la β -caténine. La progression vers le cancer de la prostate résistant à la castration pourrait impliquer des complexes β -caténine/AR et des complexes β -

caténine-TCF. Abbreviations: AR, androgen receptor; ICAT, β -catenin-interacting protein 1; p120, catenin δ 1; Tcf/LEF-1, T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1; sFRP, secreted frizzled-related protein (Kypta et Waxman, 2012).

L'augmentation de l'expression de la β -caténine est un phénomène commun dans le cancer de la prostate dû à une signalisation aberrante de Akt qui résulte d'une inactivation par phosphorylation de GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 beta*) qui favorise la formation d'une β -caténine cytosolique non complexée (Sharma et al., 2002) (Figure 4). Il a été aussi montré que dans le cancer de la prostate, la β -caténine s'associe à AR, ce qui augmente et induit l'expression de plusieurs gènes de croissance et de différenciation (Yardy et al., 2005).

En plus de ces voies, le cancer de la prostate est caractérisé aussi par une activation de la voie JAK/STAT (*Janus kinases/ signal transducers and activators of transcription*) et des dérégulations de la cascade d'activation de la voie des MAPK (Figure 5). D'autres modifications génétiques courantes incluent la mutation p53 (40%), la perte de Rb (*Retinoblastoma*) (28%), les aberrations dans BRCA1 (*Breast Cancer 1*), BRCA2 (*Breast Cancer 2*) et ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated protein kinase*) (19%) et l'amplification de MYC (*Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog*) se produit également couramment dans les cancers métastatiques (Lindeberg et al, 2013).

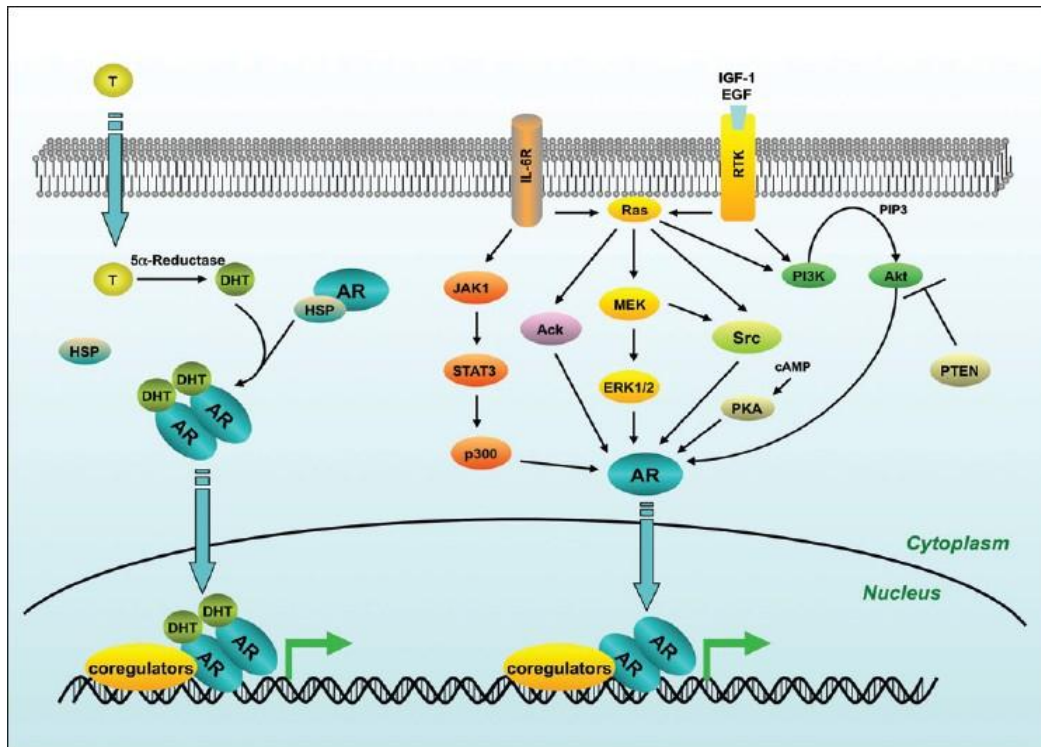


Fig.5 Activation des voies de signalisation JAK/STAT et MAPK au cours de la carcinogénèse prostatique (Lonergan et Tindall, 2011).

I.4.3.2. Rôle de l'apoptose dans la carcinogénèse prostatique

L'apoptose, appelée également mort cellulaire programmée, est un phénomène dans lequel la cellule participe à son autodestruction sous le contrôle de divers signaux internes et externes. Au cours de l'apoptose, la cellule subit plusieurs modifications morphologiques comme le rétrécissement, la condensation de la chromatine et la formation au stade final de corps apoptotiques contenant de la chromatine et du cytoplasme (Mundle et al., 1996). Un déséquilibre de l'apoptose peut conduire à diverses maladies comme le cancer (Allen et al., 1998).

Parmi les protéines qui jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose, on distingue (figure 6) celles de la famille des Bcl-2. Cette famille contient plusieurs membres qui peuvent être pro-apoptotiques comme Bax (*protéine Bcl-2-associated X*), Bid (*BH3 domain-only death agonist protein*) et Bak (Kroemer et al., 1997) ou anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-x1 (*B-cell lymphoma-extra large*). Dans la seconde phase du cancer de la prostate et suite aux altérations génétiques, des clones résistants à l'apoptose apparaissent (Tang et Poter, 1997). Bcl2 anti-apoptotique est couramment surexprimée dans le carcinome prostatique

(Krajewska, 1996). Les androgènes favorisent son expression (Berchem et al., 1995) et les patients ayant un rapport Bcl2/Bax élevé ont un risque accru de ne pas répondre à la radiothérapie. L'altération de l'apoptose suite à une surexpression des Bcl2 a été également liée aux métastases et la progression du cancer vers un état androgéno-indépendant (Coffey et al., 2001). La molécule Bax proapoptotique contient un polymorphisme au niveau d'un microsatellite instable causant un décalage du cadre de lecture dans les cellules DU-145 qui sont androgéno-indépendantes (Rampino et al., 1997).

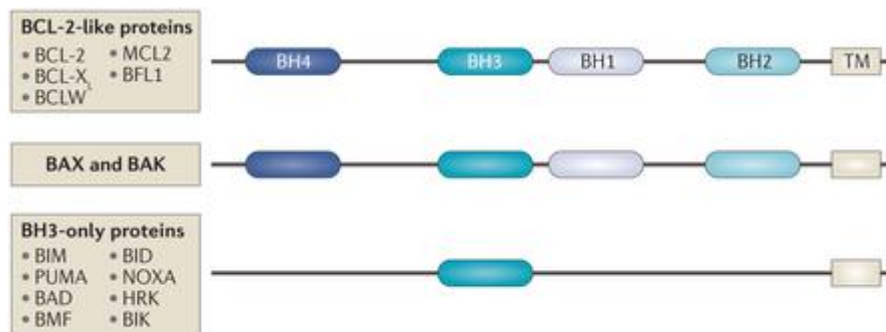


Fig.6 Schéma représentatif de la famille des Bcl2 avec ses 3 sous-groupes (Delbridge et al., 2016).

De façon intéressante, l'inactivation de PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) conduit à l'inhibition de l'apoptose (Stambolic et al., 1998) suite à l'inactivation de Bad (Datta et al., 1997) ou de la caspase -9 (*Cysteine proteases with aspartate specificity 9*) par Akt (*Protein kinase B*) (Cardone et al., 1998).

I.4.3.3. Rôle du stress oxydatif

Les espèces oxygénées réactives (EOR) sont produites par les organismes vivants au cours du métabolisme cellulaire normal. Lorsqu'elles sont présentes en concentrations faibles ou modérées, ces EOR participent au déroulement des processus cellulaires physiologiques. A des concentrations élevées, elles produisent des dégâts aux macromolécules comme les protéines, les lipides et l'ADN. Les dommages oxydatifs de l'ADN est un évènement précoce de la carcinogénèse. Ces dommages conduisent souvent à l'activation des oncogènes ou à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Valko et al., 2006). Pour faire face à ces EOR, les organismes aérobies sont munis de systèmes de défense antioxydants qui sont enzymatiques et non enzymatiques et qui servent essentiellement à les éliminer ou les

neutraliser. Cependant, dans les conditions pathologiques, les systèmes antioxydants sont le plus souvent désactivés (Birben, 2012). Le changement de l'équilibre entre prooxydants et antioxydants en faveur des premiers est appelé « stress oxydatif ».

Plusieurs études cliniques ont montré que le cancer de la prostate est lié à l'augmentation des EOR et que même la consommation des antioxydants pouvait avoir un rôle important dans la protection contre le cancer de la prostate (Chen et al., 2001 ; Wang et al., 2015). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont tenté d'élucider les mécanismes d'initiation et de progression du cancer de la prostate lié au stress oxydatif. Chez les hommes atteints, il a été suggéré que les androgènes circulants favorisent la production des EOR dans les cellules cancéreuses (Oh et al., 2016). Dans les cellules LNCaP, la production des EOR induite par AR est liée à des niveaux accrus de JunD, une des composantes principales du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein 1*) (Chen et al., 2008) qui inhibe la prolifération et favorise la différenciation cellulaire (Church et al., 2005). Mehraein-Ghomi et al., (Mehraein-Ghomi et al., 2008) ont montré que la surexpression de JunD conduit à une augmentation de la production d'EOR dans un environnement à faible taux d'androgènes et que JunD est un médiateur du stress oxydatif induit par les androgènes. Dans ce cas JunD joue le rôle de co-activateur de AR et active la voie de génération du stress oxydatif dans les cellules LNCaP (Mehraein-Ghomi et al., 2010).

Tam et al., (Tam et al., 2003), indiquèrent que l'administration de la testostérone à des rats castrés réduit les niveaux du stress oxydatif en régulant d'une manière négative l'expression de la NAPDPH-oxydase (Nox). Outre les androgènes, le facteur de transmission érythroïde 2p45 (*NF-E2 related factor Nrf2*) est considéré comme médiateur de l'expression des principales enzymes antioxydantes à travers l'élément de réponse aux antioxydants (ARE) dans le cancer de la prostate (Zhu et Fahl, 2001 ; Frohlich et al., 2008). Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) et plusieurs de ses gènes cibles sont sous-régulés dans le cancer de la prostate chez l'homme (Frohlich et al., 2008).

Dans la plupart des cas étudiés, des mutations somatiques du gène de la glutathion S-transférase (GSTP1) (Nelson et al., 2004) sont retrouvées. Les GST sont des enzymes cytosoliques qui jouent un rôle dans la phase II de détoxification. Elles catalysent la réaction de conjugaison des substrats électrophiles au glutathion (GSH). Elles possèdent également une activité peroxydase et isomérase. Elles peuvent inhiber la Jun N-terminal Kinase, protégeant ainsi les cellules contre la mort cellulaire induite par H₂O₂ (Sheehan et al., 2001).

La Glutathion peroxydase (GPx), est une autre enzyme antioxydante qui joue un rôle potentiel dans la prévention contre le développement du cancer de la prostate et sa diminution a été associée au développement des métastases (Gupta-Elera et al., 2012). Une étude réalisée par Ouyang et al., (Ouyang et al., 2005) a montré que la suppression de l'activité de la GPx entraîne le développement de tumeur prostatique chez la souris. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de la GPx dans les cellules cancéreuses de la prostate réduit la croissance tumorale à la fois *in vitro* et *in vivo*, en régulant négativement l'expression de c-MET (*Tyrosine-protein kinase Met*), un récepteur à activité tyrosine kinase du facteur de croissance des hépatocytes HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et un proto-oncogène (Bottaro et al., 1991).

La prostate est caractérisée par la présence d'une forte concentration de zinc. Ce zinc provoque un blocage dans le cycle de Krebs et l'accumulation du citrate dans le liquide prostatique. Ainsi les cellules épithéliales prostatiques sont-elles caractérisées par une faible capacité respiratoire et par conséquent une faible oxydation terminale et une moindre production d'EOR. La transformation maligne est associée à un changement métabolique précoce conduisant à une diminution de l'accumulation de zinc et à une augmentation de l'oxydation du citrate. La cellule cancéreuse est caractérisée par une respiration plus élevée et génère plus d'EOR (Khandrika et al., 2009).

Les mitochondries jouent un rôle important dans la carcinogenèse prostatique puisque elles produisent les EOR. En plus, des modifications du métabolisme associées à des mutations de l'ADN mitochondrial ont été décrites dans le cancer de la prostate (Jessie et al., 2001 ; Petros et al., 2005). Plusieurs études ont montré la présence de changements significatifs dans les sous unités mitochondriales du complexe IV dans les cellules malignes de la prostate par rapport aux cellules normales (Chen et al., 2003).

A côté des EOR, il faut noter que les espèces réactives de l'azote (RNS) jouent aussi un rôle majeur dans plusieurs maladies dont le cancer de la prostate (Gupta-Elera et al., 2012). Lorsque les niveaux des RNS augmentent, les cellules entrent dans un état de stress nitrosatif. Chez les malades atteints de cancer de la prostate, une augmentation des niveaux des RNS est observée dans les tissus. Une étude clinique a été réalisée chez des patients de Turquie et de Macédoine ayant un cancer de la prostate. Des niveaux très élevés de nitrite, de nitrate et de guanosine monophosphate cyclique qui est un indicateur du métabolisme de NO (*Nitric*

Oxide) ont été retrouvés dans le plasma de ces patients par rapport aux patients atteints d'HBP et aux personnes saines (Arsova-Sarafinovska et al., 2009).

I.4.3.4. Le récepteur des androgènes

Le récepteur AR appartient à la famille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes (Leach et al., 2016) Il est exprimé dans les tissus cibles des androgènes comme la prostate, le muscle squelettique, le foie et le système nerveux central avec des niveaux d'expression plus élevés dans la prostate, la glande surrénale et l'épididyme (Gao et al., 2005). AR est responsable de la différenciation sexuelle masculine *in utero* et de l'acquisition des caractères sexuels secondaires masculins au cours de la puberté. Chez les adultes, son rôle principal est le maintien de la libido, de la spermatogenèse, de la masse et de la force musculaires, de la densité minérale osseuse et de l'érythropoïèse (Gao et al., 2005).

C'est un facteur de transcription activé par un ligand qui contrôle l'expression de divers gènes cibles. La liaison de AR à ses deux ligands naturels la testostérone et la DHT contrôle la différenciation et le développement sexuel masculins (Lobaccaro et Sultan, 1992). Le gène codant AR est situé au niveau de Xq11-12, d'une taille de plus de 90 kb, il code pour une protéine de plus de 919 acides aminés et se compose de 8 exons. L'exon 1 code pour la région N-terminale et toute la région 5' non transcrite, les exons 2 et 3 codent pour le domaine de liaison à l'ADN (DBD), les exons 4 à 8 codent la région charnière et le domaine de liaison au ligand (LBD).

AR non activé se trouve sous forme monomérique au niveau du cytoplasme associé à des protéines chaperonnes (p23) et des Hsp (Hsp70 et Hsp90) (Pratt et al., 1997). La liaison de AR à son ligand déclenche une série de modifications conformationnelles : la séparation de AR des Hsp, la dimérisation de AR, sa phosphorylation et sa translocation nucléaire. Cette dernière est médiée par un signal de translocation nucléaire (Dehm et al., 2007). Une fois dans le noyau, le dimère AR se lie aux éléments de réponse aux androgènes (ARE) au niveau de la région promotrice des gènes cibles comme PSA et FKBP5, ce qui permet de recruter plusieurs protéines co-régulatrices qui facilitent la transcription et conduisent à des réponses cellulaires comme la croissance, la mort et la survie (Dehm et al., 2006 ; van Royen et al., 2012).

AR interagit avec des co-activateurs. Ces derniers sont des protéines qui augmentent l'activité du récepteur. Ils ont souvent une activité acétyltransférase. Les plus caractérisés sont ceux appartenant à la famille p160 comprenant SRC-1/NCOA1, SRC-2/NCOA2/TIF-2/GRIP-1 et

SRC-3/NCOA-3/AIB1/pCIP/RAC-3. Plusieurs de ces co-activateurs interagissent avec les récepteurs nucléaires à travers les motifs LxxLL (L=Leucine, x : tout autre acide aminé) qui forme une hélice α amphipathique qui se lie directement à la poche hydrophobe 1F-2 du co-activateur (Darimont et al., 1998 ; Heery et al., 1997). Des co-répresseurs ont été également identifiés comme NCoR et SMRT. AR interagit avec l'ADN via les éléments de réponse situés au niveau de la région régulatrice des gènes cibles (Brook et Bevan, 2009).

L'activation de AR peut aussi se faire par voie non génomique caractérisée par une réponse cellulaire plus rapide. Cette voie implique une activation rapide de la cascade de signalisation des kinases ou la modulation des niveaux de calcium intracellulaire (Simoncini et Genazzani, 2003).

I.4.3.4.1. Les ligands de AR

Les ligands sont classés en agonistes et antagonistes, en se basant sur leur capacité à activer ou inhiber la transcription des gènes cibles de AR. Ils modulent l'activité de AR en se liant au LBP (poche de liaison au ligand) au niveau du LBD (Lallous et al., 2013).

Les deux agonistes endogènes de AR sont la testostérone et la DHT. La testostérone est synthétisée principalement par les cellules de Leydig au niveau des testicules sous le contrôle de l'hormone LH. La sécrétion de cette dernière est régulée par une autre hormone qui est le GnRH. La majeure partie de la testostérone circulante se trouve sous forme liée à des globulines et c'est la forme libre qui rentre dans les cellules prostatiques. Dans les cellules prostatiques, la testostérone est transformée en 5 α -dihydrotestostérone (DHT) par la 5 α réductase de type 2, ce métabolite possède une très forte affinité pour AR 10⁻⁹ M, (Gao et al., 2005). La DHT diffère de la testostérone par l'absence d'une double liaison au niveau du cycle A, ce qui augmente de deux son affinité à AR et diminue de 5 fois sa vitesse de dissociation en comparaison avec la testostérone (Grino et al., 1990). Le methyltrienolone (R1881) est un agoniste synthétique ayant une activité biologique relative 2 fois plus élevée que celle de la DHT (Bonne et Raynaud, 1975). Le R1881, la DHT et la testostérone ont 18, 16 et 15 points de contact avec le LBD respectivement (liaisons de Vander Waals) avec des résidus hydrophobes d'acides aminés. Les acides aminés restant sont polaires et forment des liaisons hydrogènes avec les atomes polaires du ligand. 4 liaisons hydrogènes se forment entre le LBD et la DHT, la testostérone et le R1881 (Tan et al., 2015).

Les antagonistes de AR sont des anti androgènes qui rentrent en compétition avec les sites de liaison de AR (Helsen et al., 2014). Ces molécules peuvent être de nature stéroïdienne ou non stéroïdienne. Les anti-androgènes stéroïdiens (acétate de cyprotérone, oxendolone et spironolactone) ont un usage clinique limité dû à leurs effets indésirables. Les dérivés de la toluidine (flutamide, bicalutamide et nilutamide) sont des antiandrogènes non stéroïdiens qui ne possèdent pas d'activité androgénique et sont très utilisés dans le traitement du cancer de la prostate (Singh et al., 2000). Le mécanisme d'action structural qui décrit la liaison des antagonistes à AR est jusqu'à maintenant non clair. Il a été démontré que les antagonistes induisent le recrutement de co-répresseurs NCoR et SMRT (Dotzlaw et al., 2002 ; Hodgson et al., 2008).

I.4.3.4.2. Rôle de AR dans le cancer de la prostate

Ce sont les travaux de Huggins et de Hodges qui ont démontré le caractère androgéno-dépendant du cancer de la prostate (Huggins et Hodges, 1941). Plusieurs essais cliniques réalisés sur des patients avec un cancer de la prostate localisé ont montré que l'utilisation des antagonistes de AR comme le bicalutamide réduit le volume tumoral et le risque de sa progression, ce qui suggère que AR joue un rôle dans les stades précoces du cancer de la prostate (Zhou et al., 2015).

Durant l'initiation du cancer de la prostate, divers changements se produisent dans la voie de signalisation de AR. Les cellules intermédiaires augmentent l'expression de AR, ce qui conduit à une stimulation de la prolifération. L'expression autonome de AR devient active et ne dépend pas des signaux paracrines (Memarzadeh et al., 2011). Cette signalisation autonome entraîne l'expression de gènes de survie et de prolifération qui ne sont pas normalement régulés par les cellules intermédiaires et les cellules luminales (Memarzadeh et al., 2011).

L'augmentation de l'expression de AR pendant la phase d'initiation du cancer de la prostate peut entraîner un changement au niveau des liaisons à la chromatine ce qui facilite la prolifération maligne. La phosphorylation de AR au niveau de la sérine 81 augmente dans le cancer de la prostate et conduit à l'augmentation de la stabilisation de AR dans les cellules cancéreuses prostatiques. Cette phosphorylation joue aussi un rôle dans la régulation de la liaison de AR à la chromatine et permet le recrutement des co-activateurs (Chen et al., 2012).

Un grand nombre de modifications post-traductionnelles (PTMs) qui altèrent l'activité de AR a été découvert comme la phosphorylation, l'acétylation, la SUMOylation, la méthylation et l'ubiquitination (Coffey et Robson, 2012).

L'altération de l'interaction de AR à ses co-facteurs peut avoir un effet sur la liaison de AR à l'ADN (Zhou et al., 2015). L'amplification et la surexpression de AR ont été suggérés comme étant l'un des mécanismes conduisant à la rechute lors de la mise en place du CRPC (Bubendorf et al., 1999). Plusieurs études ont montré que les mutations de AR sont rares et que c'est le traitement par les agonistes de AR qui augmentent leur incidence (Zhou et al., 2015). L'altération des interactions entre AR et les co-régulateurs est aussi impliquée dans le développement de CRPC comme SRC-1, SRC-2 et SRC-3 (Xu et al., 2009). Par des approches d'analyse du génome à grande échelle, l'équipe de Bevan (Brooke et Bevan, 2009) a montré que AR est le récepteur nucléaire qui présentait néanmoins le plus de réarrangements dans les cancers de prostate (17% mutations, délétions, amplifications géniques) (Leach et al., 2016).

Une autre explication de la persistance de la signalisation de AR après castration est la présence d'androgènes intracellulaires à des niveaux suffisants pour activer AR (Cai et Balk, 2011) et par conséquent stimuler l'expression des gènes cibles de AR. Ils proviennent d'une synthèse *de novo* dans les cellules CRPC (Zhou et al., 2015).

I.4.3.5. Manifestations cliniques et diagnostic

Le cancer de la prostate précoce n'a généralement pas de symptômes. Cependant, il cause parfois des symptômes souvent semblables à ceux de l'HBP. Il s'agit notamment de la miction fréquente, la difficulté à uriner, l'hématurie et la dysurie (Miller et al., 2003). Le cancer de la prostate est associé au dysfonctionnement urinaire et tout changement au sein de la glande affecte directement la fonction urinaire. Ce cancer cause aussi des problèmes de la fonction sexuelle et de la performance comme des difficultés à atteindre l'érection ou des éjaculations douloureuses (Miller et al., 2003).

Par contre, le cancer avancé se métastase à d'autres organes entraînant l'apparition d'autres symptômes. Les plus fréquents sont les douleurs osseuses souvent au niveau des vertèbres, le bassin ou les côtes. Une fois au niveau de la colonne vertébrale, le cancer peut comprimer la moelle épinière causant une faiblesse au niveau des jambes et une incontinence urinaire et

aussi fécale (Van der Crujisen et al., 2005). La fatigue aussi s'installe en raison de la baisse des niveaux des globules rouges (Mustafa et al., 2016).

Au stade précoce, le cancer de la prostate est asymptomatique et est suspecté le plus souvent sur une élévation des taux sériques de PSA (*prostate specific antigen*). C'est une glycoprotéine sécrétée par les cellules luminales de la prostate dont le rôle normal est de fluidifier le liquide séminal. L'augmentation du taux sérique dans la grande majorité des cancers de la prostate, témoigne d'une production en grande quantité de cette protéine par les cellules tumorales, quoique plusieurs facteurs puissent affecter le taux de PSA comme l'âge, les infections, l'éjaculation, le cancer. Le PSA est mesuré en ng/ml. La norme la plus communément admise par les laboratoires est inférieure à 4 ng/ml. Un niveau de PSA supérieur à la norme peut être le reflet d'un problème au niveau de la prostate. Néanmoins, l'intérêt diagnostique que PSA plasmatique est sujet à controverse devant son peu de spécificité (Andriole et al., 2009 ; Schröder et al., 2009).

Le toucher rectal permet au médecin de sentir la présence de zones dures ou irrégulières en cas d'anomalies prostatiques. Le moyen le plus précis de détecter les cellules cancéreuses dans la prostate est le prélèvement chirurgical et l'examen histopathologique de la glande prostatique. La biopsie de la prostate est reconnue comme la meilleure technique de diagnostic pour détecter le cancer de la prostate (Serefoglu et al., 2013). Au final, l'imagerie IRM et la scintigraphie permettent d'évaluer les atteintes extra-prostatiques et de détecter la présence de métastases osseuses dans les formes les plus avancées (Galani, 2015).

I.4.3.6. Traitement du cancer de la prostate

Pour les cancers localisés, les options disponibles pour le traitement sont la prostatectomie radicale ou la radiothérapie. S'il y a un risque moyen ou élevé de récurrence, l'approche utilisée est une association de déprivation androgénique (ADT) et de radiothérapie (Shafi et al., 2013). L'ADT inclut la castration chimique notamment par l'utilisation d'antagonistes de AR mais aussi les thérapies combinées faisant appel à des agonistes ou des antagonistes de la LHRH qui vont bloquer la sécrétion de LH et donc la production de testostérone testiculaire. Elle peut se faire chirurgicalement par orchectomie (Shafi et al., 2013).

L'association de la radiothérapie et de l'ADT a montré une amélioration de la survie dans plusieurs essais. Elle peut être utilisée avant ou après la radiation (Shafi et al., 2013).

La majorité des patients répondent initialement au blocage des androgènes. Cependant, après deux ans ils développent une résistance et un échappement androgénique et se transforment en CRPC (Agoulnik et Weigel, 2006).

L'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de ce CRPC représentent aujourd'hui un défi majeur pour les scientifiques. La conception rationnelle des médicaments qui est l'application d'une relation structure-fonction pour le développement de ligands plus sélectifs, est maintenant largement utilisée dans la chimie pharmaceutique moderne. Mais, la question qui se pose ici est de savoir comment les informations structurales disponibles sur les interactions AR-ligand obtenues par cristallographie et par modélisation, peuvent être exploitées pour la conception rationnelle d'une nouvelle génération d'anti-androgènes afin de surmonter les problèmes de résistance aux anti-androgènes ? Les structures disponibles des complexes AR-ligand révèlent une explication claire de la façon dont les changements dans un seul résidu peuvent entraîner des changements spectaculaires dans les propriétés de liaison du ligand et de mettre en évidence des déterminants clés de la spécificité et de l'affinité récepteur-ligand. Cette information facilitera grandement le développement de nouveaux antagonistes pour le traitement du cancer de la prostate. Plusieurs domaines fonctionnels tout le long de AR peuvent être ciblés par de petites molécules (Tan et al., 2015).

L'acétate d'abiratérone fait depuis peu partie des traitements du CPRC. Cet inhibiteur sélectif de la biosynthèse des androgènes est un antagoniste de l'enzyme CYP17A1 (17 α -hydroxylase/C17,20 lyase) qui permet la synthèse de testostérone. Cependant, les résultats des essais menés avec l'abiratérone ont montré que jusqu'à 50 % des patients semblent d'emblée résistants au traitement, d'où l'importance d'identifier des facteurs prédictifs de réponse (Basset et al., 2013). Depuis avril 2013, l'enzalutamide est également indiqué en Europe pour le traitement du CPRC (Basset et al., 2013). Cet anti-androgène bloque la translocation nucléaire de AR et sa fixation à l'ADN. Dans le seul essai de phase III avec l'enzalutamide publié, 46 % des patients n'avaient pas de réponse sur le PSA sous enzalutamide (Basset et al., 2013).

La chimiothérapie reste l'approche utilisée lorsque le cancer atteint cette phase (Berthold et al., 2008). Depuis 2004, le docétaxel était la molécule de référence dans le cancer métastatique de la prostate (Basset et al., 2013). Le docétaxel agit en empêchant la dissociation des microtubules et la mitose. Il diminue aussi l'expression de AR au niveau

protéique ce qui suggère qu'il agit aussi à travers l'inhibition de AR (Zhu et al., 2010 ; Darshan et al., 2011).

Outre le docetaxel, d'autres agents chimiothérapeutiques comme le cabazitaxel, le mitoxantrone, l'estrามustine et le vinblastine sont aussi utilisés pour traiter les patients avec un stade avancé (Kellokumpu-Lehtinen et al., 2013).

I.4.3.7. Les modèles *in vivo* et *in vitro* du cancer de la prostate

Tout modèle est par définition une représentation imparfaite de ce qu'il imite. Indépendamment de l'exactitude d'un modèle de cancer, sa valeur réelle doit être mesurée par sa capacité à guider la recherche, et d'un point de vue pratique, à protéger la santé humaine (Kemp, 2015).

Les modèles animaux, plus particulièrement les modèles murins, jouent un rôle primordial dans l'étude de l'étiologie, de la prévention et du traitement du cancer de la prostate. Néanmoins, jusqu'à présent, peu de modèles animaux pertinents reflètent la complexité des événements qui se produisent au cours du processus pathologique. Les modèles disponibles aujourd'hui sont limités aux quelques espèces connues pour leurs capacités à développer spontanément un cancer de la prostate. Des lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate sont aussi disponibles (Lamb et Zhang, 2005).

I.4.3.7.1. Les lignées cellulaires

Dans le domaine de la recherche contre le cancer de la prostate, les chercheurs utilisent principalement 3 types de lignées cellulaires : les cellules LNCaP, PC3 et DU-145, ainsi que quelques dérivations clonales de ces lignées.

Au cours des années, de nouvelles lignées cellulaires et dérivés clonaux ont été développés en utilisant divers procédés comme la mutagenèse, altérations génétiques induites par la castration des animaux xéno greffes ainsi que la transformation virale (Sobel et Sadar, 2005).

La plupart des lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate ont été établies à partir de métastases à l'exception de PC-93 (Claas et van Steenbrugge, 1983), qui est cultivée à partir d'une tumeur primaire androgéno-dépendante.

a. Cellules DU-145

Isolées à partir de métastases cérébrales du cancer de la prostate d'un homme de 60 ans en 1975 (Lesko et al., 1996). Ce sont des cellules aneuploïdes hormono-indépendantes à 64 chromosomes n'exprimant ni AR ni PSA. Lorsque les DU-145 sont injectées à des souris immunodéprimées *Nudes*, elles maintiennent leur phénotype et leur génotype et métastasent à plusieurs organes. Elles expriment EGF et TGF α (Bastilde et al., 2002).

b. Cellules PC-3

La lignée PC3 a été obtenue à partir de métastases vertébrales prélevée dans les heures suivant la mort en 1979 d'un patient de 62 ans porteur d'un cancer de la prostate androgéno-indépendant. Ces cellules sont androgéno-indépendantes n'exprimant ni AR ni PSA. Elles sont aneuploïdes, contiennent 60 chromosomes et ont un temps de dédoublement de 33 heures.

Leur croissance autonome est principalement due à de hauts niveaux d'expression de TGF α et EGF-R (Ching, 1993). Elles expriment une p53 aberrante et ont un PTEN muté (Barlaam et al., 2015).

c. Cellules LNCaP

Les cellules LNCaP ont été isolées à partir de métastases lymphatiques d'adénocarcinome humain. Ce sont des cellules sensibles aux androgènes qui expriment AR et PSA (Horoszewicz et al., 1980). AR est muté (mutation T877A au niveau de la séquence codante de AR) et répond à plusieurs stéroïdes non androgéniques (Veldscholte et al., 1990). Son temps de dédoublement varie entre 60 et 70 h. Les LNCaP se caractérisent aussi par l'inactivation de PTEN et l'expression des cytokératines 8, 18 et 20 ainsi que de la p53 (Carroll et al., 1993 ; Carson et al., 1999).

Des lignées cellulaires moins utilisées et moins bien caractérisées comme EB-33, PC-93, TSU-PR1, JCA-1, ND-1, PPC-1 et DuPro-1 sont aussi disponibles (Cunningham et You, 2015).

I.4.3.7.2. Les modèles animaux

a. Les souris porteuses de xénogreffes

Chez les souris immunodéficientes, la croissance tumorale se produit après implantation des cellules humaines ou xénogreffes. En 1966, Flanagan avait proposé que les modèles de rongeurs immunodéficients puissent être utilisés pour étudier le cancer de la prostate plus spécifiquement les souris *Nudes*. L'avantage de cette approche par rapport à une étude *in vitro* est la présence d'une structure tridimensionnelle complète avec angiogenèse, facteurs paracrines, hormones, interactions stromales et aussi métastases.

b. Les souris transgéniques (génétiquement modifiées)

Ces modèles reproduisent en profondeur les différentes étapes du cancer de la prostate et les mutations génétiques humaines associées à la progression tumorale (DeCaprio et al., 1988). Les stratégies utilisées pour le développement de ces souris sont l'expression des oncogènes viraux (virus SV40) dans les tissus prostatiques ou bien, la manipulation génétique des voies impliquées dans le cancer de la prostate. De forts promoteurs spécifiques comme ceux de la probasine et du PSA sont nécessaires pour diriger l'expression ciblée du gène cible dans l'épithélium prostatique. Les gènes cibles manipulés sont ceux qui altèrent l'expression des facteurs de croissance et de leurs récepteurs, les régulateurs du cycle cellulaire, les gènes pro- et anti-apoptotiques, les récepteurs des hormones stéroïdiennes, les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (Lamb et Zhang, 2005).

c. Les souris allogreffes

C'est un système de tumeurs généré chez la souris en utilisant des lignées de cellules tumorales ou des tissus dérivés du même fond génétique et de ce fait le matériau transplanté et l'hôte partagent la même souche (Foster et al., 1997). Les lignées cellulaires TRAMP-C1/2/3 dérivées de l'épithélium prostatique des souris TRAMP et PTEN-CaP dérivées de la souris transgénique du cancer de la prostate *Pten-null* sont toutes dans la souche C57BL/6 (Jiao et al., 2007). PNEC30, générée des cellules neuroendocrines du cancer de la prostate de la souris, sont dans la souche BALB/c (Hu et al., 2004).

d. Les souris *knockout* (KO)

C'est un modèle de souris basé sur le retrait de gènes suppresseurs de tumeurs soit par délétion de séquences entières ou d'une partie de celles-ci. Le premier modèle de souris KO a été créé en 1993, mais il n'était pas capable de développer le cancer de la prostate (Lohnes et al., 1993).

Au cours des dernières années, différents modèles KO de cancer de la prostate ont été développés, en utilisant le système de recombinaison Cre-loxP pour exciser les régions d'ADN spécifiques dans les cellules somatiques à travers la régulation des gènes par les promoteurs spécifiques comme la probasine ou PSA. Ces KO ont été générés pour plusieurs gènes comme PTEN, pRb, p53, Apc et IGF-1 (Rea et al., 2016).

II. Le benzo(a)pyrène dans la prostate

Comme déjà abordé dans le chapitre précédent, le cancer de la prostate est une maladie multifactorielle dont le risque augmente surtout avec l'âge, l'origine ethnique, l'alimentation et l'histoire familiale avec la maladie.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont aussi considérés comme facteurs de risque environnemental potentiel pour le cancer de la prostate. Ces molécules exercent leurs propriétés cancérigènes par la capacité à former des adduits d'ADN. Les études cas-témoins et les études de cohorte ont révélé que la plupart des emplois associés à l'exposition professionnelle aux HAP présentent un risque de cancer de la prostate. Les associations entre le cancer de la prostate et les sources spécifiques d'exposition professionnelle aux HAP ont également été rapportées. Il a été aussi montré que des adduits HAP-ADN se forment aussi dans la prostate (Rybicki et al., 2006).

II.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent un groupe de composés ubiquistes organiques d'une centaine de molécules chimiques, lipophiles et persistantes qui ont des structures différentes et des degrés variables de toxicité. Comme molécules organiques elles contiennent des atomes de carbone et d'hydrogène avec deux à plusieurs cycles benzéniques (Di-Toro et al., 2000 ; Arey et Atkinson, 2003).

Ils se trouvent généralement dans l'environnement sous forme de mélange. Leur toxicité provient de leur interférence avec le fonctionnement des membranes cellulaires mais aussi avec les systèmes enzymatiques (Rengarajan et al., 2015).

Les HAP sont retrouvés dans tous les milieux (sol, air et eau) et possèdent des effets mutagènes et carcinogènes, et ont également des effets immunosuppresseurs importants (Armstrong et al., 2004). Ils peuvent se former durant les processus biologiques et sont le produit de la combustion incomplète des composés organiques. Ce sont donc des polluants qui ont une forte toxicité avec une origine pyrolytique anthropique : combustion des carburants automobiles, domestiques (charbon bois, fuels...), production industrielle (aciéries, alumineries...), production d'énergie par les centrales électriques fonctionnant au pétrole, au gaz ou au charbon, ou encore la cigarette. Parmi les différents HAP (figure 7), on retrouve le

Benzo(a)pyrène, qui fait l'objet d'une place particulière dans cette introduction car utilisé pour certaines de nos expériences *in vivo*.

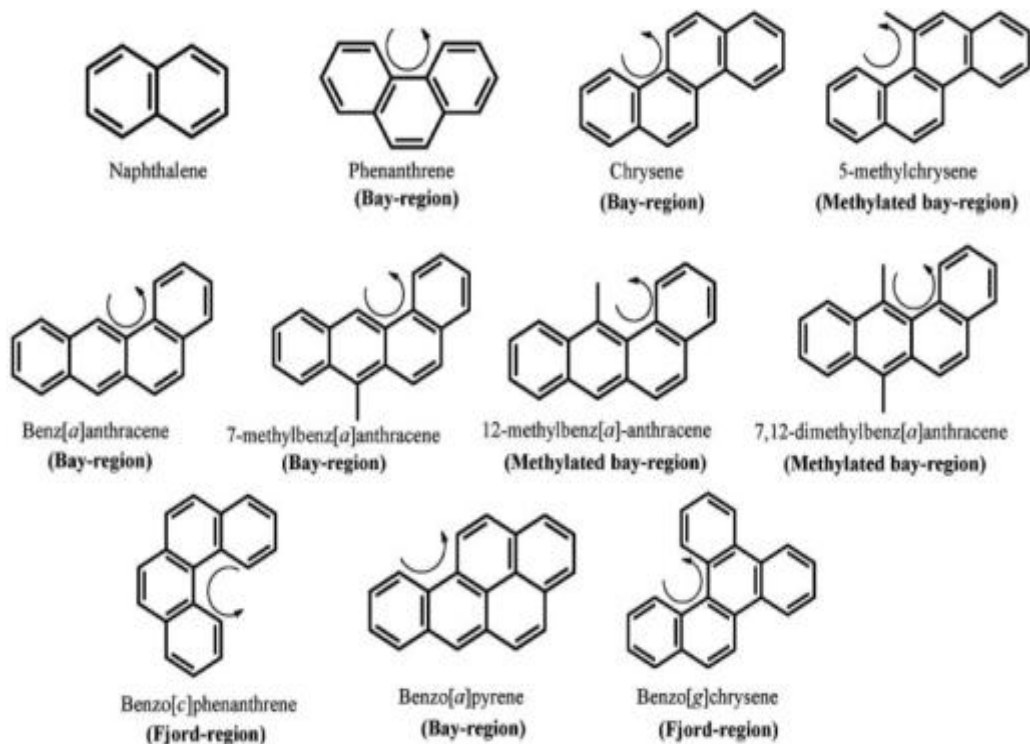


Fig.7 Structure chimique de quelques HAP (Zhang et al., 2012a).

II.2. Benzo(a)pyrène [B(a)P]

Le benzo(a)pyrène (B(a)P) est un HAP à 5 anneaux aromatiques (figure 7) d'une structure cristalline solide et de couleur jaune pâle ayant une faible odeur aromatique. Il est faiblement volatil et insoluble dans l'eau. Dans l'air, le B(a)P se trouve adsorbé à des particules mais peut aussi exister sous forme de vapeur à haute température (ATSDR, 1995).

Le B(a)P résulte de la combustion incomplète des composés organiques. Il se trouve dans les combustibles fossiles, l'huile de schiste, les huiles brutes et les goudrons de houille. Il est libéré dans l'environnement via des sources naturelles (comme les feux de forêt) et des sources anthropiques comme déjà vu plus haut (ATSDR, 1995). Les ouvriers travaillant dans la production de l'aluminium, du graphite, du carbure de silicium et la distillation du goudron sont aussi fortement exposés au B(a)P.

II.3. Exposition de la population générale

La population est susceptible d'être exposée par l'eau et la nourriture étant donné que plus de la moitié du B(a)P dans l'air finit par se déposer au sol et dans les systèmes aquatiques (ATSDR, 1995). Les principales sources d'exposition résidentielles et commerciales sont dues au chauffage au bois, au charbon, à l'huile ou au gaz, ... L'inhalation sur le lieu de travail peut être la voie principale d'exposition, surtout dans les cas impliquant des procédés de combustion. Dans certaines circonstances, la voie cutanée peut devenir la voie principale d'exposition au B(a)P au milieu de travail (Förster et al., 2008).

II.4. Toxicité du B(a)P

Le benzo(a)pyrène est une molécule génotoxique. Le B(a)P provoque *in vitro* des mutations ponctuelles chez *Salmonella typhimurium* et des dégâts au niveau des chromosomes humains, lors d'une activation métabolique (Busby et al., 1995).

Dans l'adénocarcinome pulmonaire, le B(a)P induit 3 types de mutations du codon 12 de *ki-ras* chez les souris A/J : GGT → TGT (56,3 %), GGT → GTT (25 %) et GGT → GAT (19 %) (Mass et al., 1993). Il induit aussi la mutation du codon 13 (DiGiovanni et al., 1993) et du codon 61 (Chakravarti et al., 1995) de *c-Ha-ras* dans les papillomes cutanés des souris Sencar.

L'exposition au B(a)P augmente aussi la fréquence des micronoyaux. Des souris mâles exposées au B(a)P à des doses de 25, 50 ou 75 mg/kg /jour pendant 28 jours par gavage, ont montré une augmentation significative de la fréquence des réticulocytes micronucléés et des adduits d'ADN lorsqu'elles sont sacrifiées 3 jours après l'exposition finale (Lemieux et al., 2011). Les effets sur la reproduction et l'immunité comprennent la diminution de la taille des ovaires et du nombre des follicules (Xu et al., 2010) ainsi que la diminution de la taille du thymus et des IgM circulants (De Jong et al., 1999) chez le rat. L'exposition des souris au B(a)P par voie orale entraîne des effets sur les fœtus : avortements, malformations (hémangiomes, pigments anormaux au niveau de la peau, fente labio-palatine) ainsi que la naissance d'une descendance stérile (Legrauerend et al., 1984 ; Shum et al., 1979). Chez les rats Sprag-Dawley mâles, l'exposition par voie orale au B(a)P à une dose de 5 mg/kg par jour pendant 12 semaines (Chen et al., 2011), et les rats Swiss Albinos mâles, l'exposition par voie orale au B(a)P à une dose de 50 mg/kg/jour/10 jours (Arafa et al., 2009), provoquent la diminution du nombre des spermatozoïdes, une augmentation du nombre des spermatozoïdes

anormaux et un changement des niveaux de testostérone et des enzymes de la stéroïdogenèse testiculaire.

Actuellement classé comme « cancérogène reconnu » pour l'Homme (groupe 1) (IARC, 2010), le B(a)P agit dans tous les niveaux du processus de la carcinogenèse : i) initiation, à travers sa génotoxicité et son interaction à l'ADN ; ii) promotion, par son action sur la prolifération à travers l'hyperméthylation ou l'hypométhylation de l'ADN (Sadikovic et Rodenhiser, 2006) ; iii) progression, en altérant les communications cellulaires (Lee et al., 2013) ainsi que son action épigénétique en influençant la régulation des gènes (Hockley et al., 2007). Par son action sur les jonctions adhérentes et lacunaires, le B(a)P perturbe les mécanismes de diffusion des molécules de signalisation responsables du contrôle de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire (Tekpli et al., 2010).

Chez le hamster, par exemple, le B(a)P induit la formation de tumeurs au niveau du système respiratoire (pharynx et larynx) et du système digestif après exposition par inhalation (Thyssen et al., 1981). L'administration par voie intra-gastrique du B(a)P à une dose allant de 67 à 100 mg/kg, conduit à la formation de papillomes gastriques ainsi que des adénomes pulmonaires chez la souris (Sparnins et al., 1986). L'administration du B(a)P par gavage à des doses de 0, 3, 10 ou 30 mg/kg à des rats Wistar 5 jours par semaine pendant 104 semaines entraîne le développement d'un papillome au niveau du préestomac et celui de tumeurs hépatiques. Les males sont plus sensibles (3 mg/kg) que les femelles (10mg/kg) (Wester et al., 2012).

II.5. Toxicocinétique du B(a)P

II.5.1. L'absorption

Le B(a)P peut être absorbé par différentes voies. Les 3 voies principales d'absorption sont la voie cutanée, respiratoire (inhalation) et gastrique (ingestion). La vitesse et la quantité de B(a)P absorbé dépendent surtout du véhicule. Kawamura et al., (Kawamura et al., 1988) ont montré que l'administration du B(a)P avec divers aliments modifie son absorption chez les rats. Cette absorption est de 42 % à 50 % avec les aliments lipophiles. Elle diminue de 20 % à 30 % avec les autres aliments.

II.5.2. La distribution

La distribution du B(a)P est similaire après administration sous cutanée, intraveineuse ou intra-trachéale chez les souris et les rats. Il est détecté dans tous les organes après quelques minutes à quelques heures suivant l'administration (Foth et al., 1988).

Ramesh et al., (Ramesh et al., 2001) ont montré la présence d'une grande distribution du B(a)P dans le plasma 6 heures après son administration par voie orale. 10 % de cette dose a été détectée dans le foie après 24 heures alors que 45 % a été éliminée dans les urines et les fèces. Pour étudier la distribution après administration par voie intra-trachéale, Weyand et Bevan (Weyand et Bevan, 1986) ont administré du B(a)P marqué au ³H. Après 5 min, le B(a)P se distribue 60 % au niveau des poumons et 13 % dans le foie. Après une heure, 27 % de radioactivité est retrouvée dans la carcasse, 24 % dans les intestins, 16 % dans le foie et 15 % dans les poumons. Le tissu adipeux et les glandes mammaires constituent des sites très importants de distribution et d'accumulation de B(a)P dû à sa nature lipophile (Modica et al., 1983).

Le B(a)P peut aussi traverser la barrière placentaire chez la souris et le rat (Madhavan et Naidu, 2000).

II.5.3. La biotransformation

Le B(a)P est métabolisé par les enzymes de phase I, les cytochromes P450s (CYPs), qui donnent des composés plus hydrophiles tels des époxydes, des dihydrodiols, des phénols et des quinones (Osborne et Crosby, 1987). Ces derniers forment une classe de métabolites cancérigènes ultimes du B(a)P. Les principaux CYPs impliqués dans la formation des diols et des diol-époxydes sont le CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 (Shinada, 2006). Le B(a)P induit les cytochromes à travers la liaison au récepteur AhR, ce qui entraîne des changements dans la transcription génétique des CYPs et des enzymes de la phase II (Shimizu et al., 2000) qui vont conjuguer les produits obtenus. Plusieurs voies métaboliques sont impliquées dans la biotransformation du B(a)P qui aboutissent à la formation d'un radical cation, de différents métabolites hydroxylés, d'orthoquinones et des diol-époxydes.

II.5.3.1. Voie des diol-époxydes

Cette voie consiste en une série de biotransformations qui aboutit à la formation d'un diol-époxyde : une transformation du benzo(a)pyrène en benzo(a)pyrène 7,8-oxyde par CYP1A1 et CYP1B1 puis en benzo(a)pyrène-7,8-diol par l'époxyde hydrolase qui se transforme sous l'action de CYP1A1 et CYP1B1 en benzo(a)pyrène 7,8-diol-9,10-époxydes (Xue et Warshawsky, 2005). Ces métabolites sont considérés comme génotoxiques et cancérigènes.

Les diol-époxydes interagissent avec l'ADN, principalement avec les purines, la désoxyguanosine et la désoxyadénosine principalement au niveau d'une région appelée région baie (Phillips et Grover, 1994) et chaque diol-époxyde peut former à la fois des adduits *cis* et *trans* ce qui donne un total de 16 adduits d'ADN-benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde (ADN-BPDE) (Figure 8). La proximité entre la région baie et la fonction époxyde permet sa stabilité chimique et crée une gêne stérique empêchant sa conjugaison au GSH.

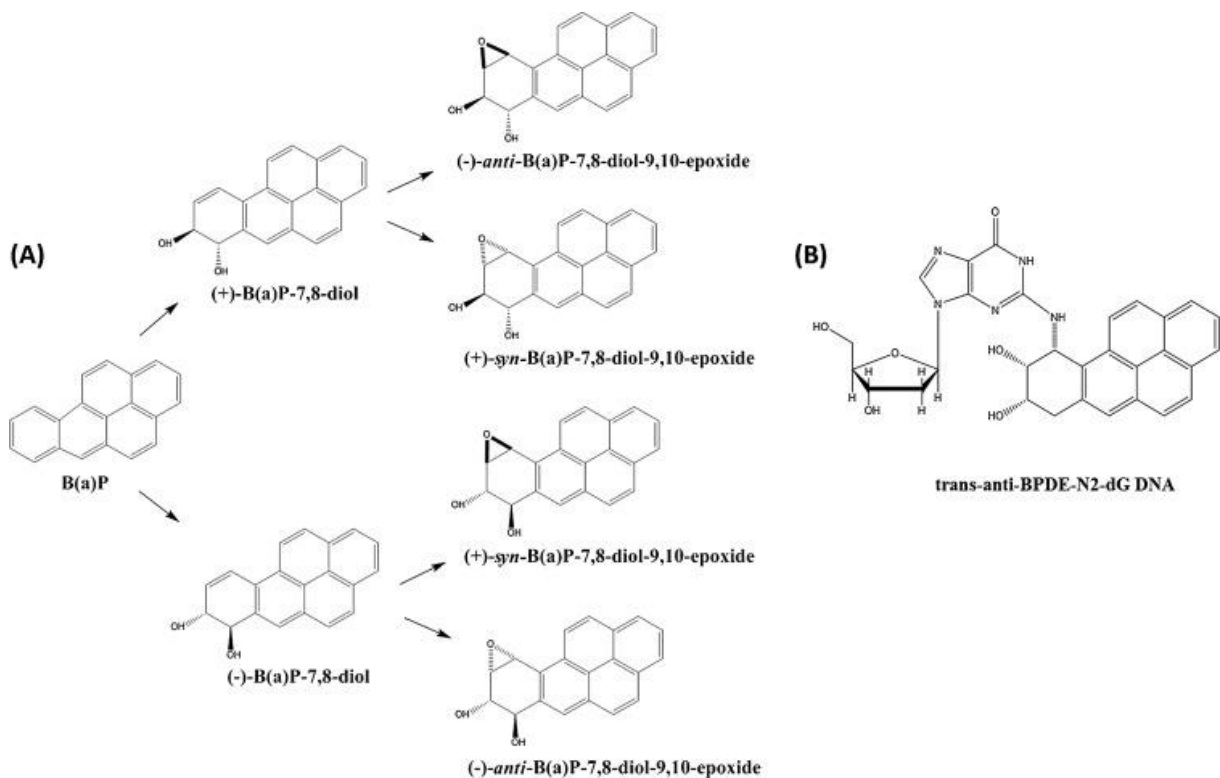


Fig.8 (A) : Métabolisme du B(a)P en diol-époxydes. (B) : Interaction du (+)trans BPDE avec l'ADN et formation de l'adduit (+)-trans anti-BPDE-N2-dG-ADN (Kasala et al., 2015).

Le 7R,8S-dihydroxy-9R,10R-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrène (appelé également anti-benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-epoxyde ou (+)-antiBPDE) est l'isomère le plus réactif vis-à-vis de l'ADN et peut former à la fois des adduits stables et instables (appelés dépurinants) avec l'ADN (Chakravarti et al., 2008). Ces adduits ont une stabilité chimique élevée qui dépend de leur lieu de formation et du type d'exposition. Après une unique injection par voie intrapéritonéale du B(a)P à des rats, leur demi vie est de 22 jours dans le poumon, 17 jours dans les lymphocytes périphériques et 15 jours dans le foie (Ross et al., 1990). Après des injections répétées, leur demi-vie atteint 127 jours dans les lymphocytes périphériques, 106 jours dans les poumons et 31 jours dans le foie (Qu et Stacey, 1996).

Chez les souris traitées avec du B(a)P, l'adduit le plus stable formé au niveau de l'épiderme est le BPDE (Melendez-Colon et al., 1999). Les tumeurs cutanées provoquées par le B(a)P chez la souris présentent des mutations G → T dans le codon 13 et des mutations A → T dans le codon 61 du gène Ha-Ras (Chakravarti et al., 2008).

II.5.3.2. Voie du cation radicalaire

C'est le déplacement d'un électron de la molécule grâce à une oxydation par les peroxydases des CYPs et qui forme un cation radicalaire localisé au niveau du carbone 6. Ce cation radicalaire entraîne la formation d'adduits covalents avec la guanine (en position N7) et l'adénine (en position N3 ou N7). Ces adduits sont instables et génèrent des sites apuriniques. Mais seuls les faibles niveaux de sites apuriniques ont été mesurés au niveau de l'épiderme de souris traitées avec le B(a)P (Melendez-Colon et al., 1999). Les sites apuriniques sont le lieu de dommages importants à l'ADN.

Les rats traités par voie intrapéritonéale par le B(a)P, excrètent du 7-(benzo(a)pyrène-6-yl)-N7-guanine dans les fèces et l'urine. Cet adduit a été aussi détecté dans les tissus pulmonaires de souris traitées avec du B(a)P par voie intrapéritonéale (Banasiewicz et al., 2004).

II.5.3.3. Voie des quinones/espèces réactives de l'oxygène

C'est une oxydation enzymatique du benzo(a)pyrène-7,8-diol en benzo(a)pyrène-7',8-quinone, molécule réactive électrophile vis-à-vis de l'ADN, par les aldo-céto-réductases (AKR) (Mangal et al., 2009). Dans les lignées cellulaires humaines A549 du cancer du

poumon, le benzo(a)pyrène-7,8-quinone augmente la formation du 8-oxo-désoxyguanosine (Mangal et al., 2009).

Le benzo(a)pyrène-7,8-quinone peut également subir un cycle répétitif d'oxydoréduction qui génère des espèces oxygénées réactives (EOR) qui endommagent l'ADN (Penning et al., 1999).

Il existe aussi plusieurs autres sources des EOR induites par le B(a)P. Les souris et les rats métabolisent le B(a)P en benzo(a)pyrène-1,6-quinone (figure 9), benzo(a)pyrène-3,6-quinone et benzo(a)pyrène-6,12-quinone à partir du 6-oHB(a)P par des réarrangements non enzymatiques. Ces quinones entrent dans le cycle redox et sont responsables de l'induction de mutations (Xue et Warshawsky, 2005).

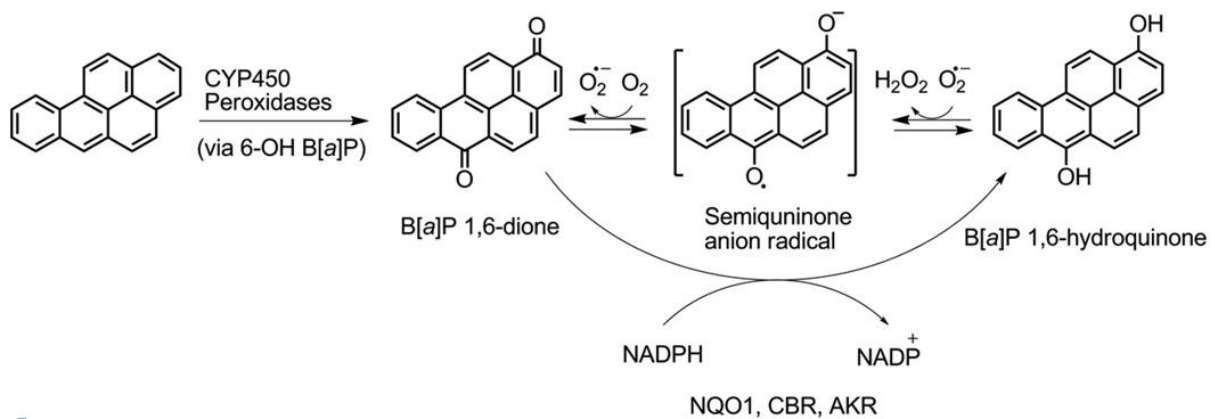


Fig.9 Cycle redox de la formation benzo(a)pyrène-1,6-quinone (Sen et al., 2012).

Les intermédiaires réactifs du B(a)P (oxydes, diol-époxydes et cations radicalaires) ainsi que les EOR générées par la quinone peuvent perturber l'équilibre de la balance pro-oxydants/anti-oxydants en réduisant les niveaux des antioxydants ce qui entraîne un stress oxydant. Parmi ces EOR, il y a principalement l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le H_2O_2 peut par la suite donner naissance à un autre radical, le radical hydroxyle OH^{\cdot} qui est très réactif vis-à-vis de l'ADN (Kim et Lee, 1997).

II.5.3.4. Mécanisme à travers le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR)

Le récepteur des hydrocarbures aromatiques (*Aryl hydrocarbon receptor, AhR*) est un facteur de transcription cytosolique ligand-dépendant et est l'intermédiaire de plusieurs effets toxiques et cancérigènes chez les animaux et l'Homme. Son activation est à l'origine des effets toxiques et cancérigènes d'une grande variété de contaminants environnementaux comme la dioxine, les HAP et les biphényles polychlorés. L'activation de AhR conduit à l'induction de plusieurs gènes de détoxification comme ceux qui codent pour les enzymes de phase I de métabolisation des xénobiotiques : les cytochromes CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 et CYP2S1 et les enzymes de la phase II comme la glucuronosyl transférase UGT1A6, NAD(P)H-dépendent quinone oxydoréductase-1NQO1, l'aldéhyde déshydrogénase ALDH3A1 et les glutathion S-transférases (Okey, 2007 ;Vogel et Haarmann-Stemmann, 2017).

Le cytochrome P450 est un nom donné à une grande famille d'enzymes polyvalentes qui métabolisent la majorité des médicaments, des toxiques et des xénobiotiques. Les cytochromes jouent aussi un rôle important dans plusieurs processus physiologiques comme la biosynthèse du cholestérol et des stéroïdes, le métabolisme des acides gras et le maintien de l'homéostasie du calcium (Dutour et Poirier, 2017).

Les mutations du gène CYP450 ou une déficience des enzymes P450 sont cliniquement pertinents dans de nombreux cas (McKinnon et Sorich, 2008). Le fil commun de toutes les enzymes CYPs est un motif peptidique conservé proche de la partie c-terminale: phe-x(6-9)-Cys-x-Gly (où x est un aa quelconque) ; cette cystéine lie l'hème ferrique octahydré et participe au transfert d'un atome d'oxygène atmosphérique dans le substrat, situé dans la poche proche de reliure du substrat. Tous les mammifères possèdent 18 gènes de CYPs avec des variations considérables dans le nombre des membres de chaque sous famille (Dutour et Poirier, 2017).

AhR est un membre de la famille des Bhlh/PAS des facteurs de transcription hétérodimères (*basic region helix-loop-helix/Period[PER]-Aryl hydrocarbo receptor nuclear translocator [ARNT]-single minded [SIM]*) (Vogel et Haarmann-Stemmann, 2017) dont le rôle physiologique est la régulation du développement, le contrôle du rythme circadien, la neurogenèse, le métabolisme et la réponse contre le stress induit par l'hypoxie. L'ablation du gène de AhR entraîne des maladies cardiovasculaires, la fibrose hépatique, une diminution de la taille du foie et une fibrose cutanée (Barouki et al., 2007).

En absence de son ligand, AhR se trouve au niveau du cytoplasme sous forme d'un complexe protéique contenant deux molécules d'Hsp 90, la protéine p23 et XAP2 (Petrulis et al., 2003). La liaison de AhR au ligand induit son activation, sa dissociation des protéines chaperones, son hétérodimérisation avec ARNT et sa translocation au noyau. Au niveau du noyau, l'hétérodimère interagit avec diverses histone-acétyltransférases et des facteurs de remodelage de la chromatine (Schnekenburger et al., 2007 ;Vogel et Haarmann-Stemmann, 2017). Le complexe formé se lie à des séquences de régulation appelées AhREs (*Aryl Hydrocarbon Response Elements*, XREs ou DREs) localisées au niveau des régions promotrices des gènes cibles ce qui conduit à l'initiation de la transcription (Figure 10).

Dans la prostate, AhR est exprimé au cours du développement fœtal dans la prostate normale et pathologique (Chad et al., 2009). L'exposition des fœtus des souris sauvages C57BL/6J au TCDD (5 µg/kg) pendant la gestation réduit de 87 % le poids de la prostate ventrale et l'expression des gènes spécifiques de la prostate ventrale de 99 % et altère la différenciation des cellules épithéliales de la prostate ventrale (Lin et al., 2002). Les autres lobes sont aussi altérés mais d'une façon moins importante. Ce mécanisme d'altération est dépendant du ligand.

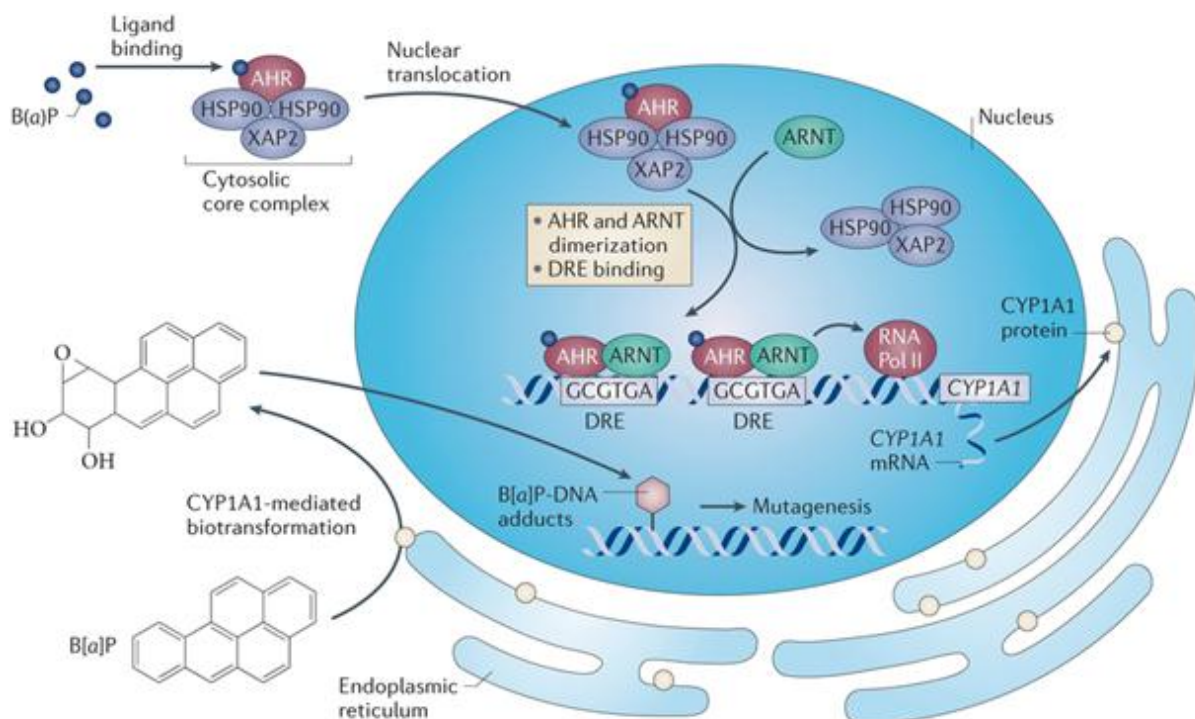


Fig.10 Mécanisme d'activation du récepteur AhR par le B(a)P. Hsp : *Heat shock protein* ; ARNT : *AhR nuclear translocator* ; DRE : *dioxin responsive element* (Murray et al., 2014).

Kollara et Brown (Kollara et Brown, 2009) ont montré que le récepteur AhR augmente l'activité transcriptionnelle de AR en absence des androgènes. AhR et ARNT interagissent avec AR mais seul AhR est capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle de AR en absence de ligand (Kollara et Brown, 2010).

L'analyse des tissus prostatiques par immunohistochimie a révélé une augmentation de l'expression de AhR dans les cellules tumorales (Kashani et al., 1998). Gluschnaider et al. (Gluschnaider et al., 2010) ont également montré dans leur étude une activation significative de AhR dans les cellules tumorales par rapport aux cellules de l'épithélium glandulaire bénin.

II.5.4. Conjugaison et élimination du B(a)P

Après métabolisation du B(a)P, les métabolites formés vont être conjugués puis éliminés ou éliminés directement sans conjugaison (20 % des métabolites). Les métabolites les plus électrophiles sont rapidement conjugués au glutathion soit directement soit sous l'action des enzymes de la famille des glutathion S-transférases GSTM1, GSTA1 et QSTP1 puis transformés en acides mercapturiques (ATSDR, 1995). Le dérivé tétrahydro-trihydroxy-BaP-7-S-N-acétylcystéine (BaP-7-NAc) est l'acide mercapturique majoritaire retrouvé chez le rat après administration intrapéritonéale du B(a)P (Yang et al., 1998). Les quinones sont conjugués à l'acide glucuronique sous l'action des UDP-glucuronyltransférases (UGT) de type 2B7, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10 (IARC 2010). Dans les cellules pulmonaires humaines, le 7,8-catechol du B(a)P est conjugué par la sulfotransférase 1A1 (Zhang et al., 2012b). Certains polymorphismes des enzymes de phase II de conjugaison comme les GST, l'uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférases et sulfotransférases modulent la sensibilité au cancer (Shimada, 2006).

Les métabolites électrophiles formés sont ensuite transportés dans le milieu extracellulaire par les protéines transmembranaires *ATP Binding Cassette* (transporteurs ABC) (Ebert et al., 2005).

Chipman et al. (Chipman et al., 1981) ont montré que l'excrétion biliaire est la première voie d'élimination du B(a)P indépendamment de la voie d'administration. Ils ont suggéré que l'excrétion du B(a)P après exposition par voie orale est la plus rapide étant donné que l'effet du premier passage hépatique a une contribution importante. Huit heures après administration intrapéritonéale du B(a)P, Kim et al. (Kim et al., 2012) ont montré que 24 % de la

radioactivité est présente dans la bile. Après 32 heures, 50 % est retrouvée dans les fèces après injection intraveineuse (Moir et al., 1998). 96 % du C14-B(a)P sont retrouvés dans les fèces après exposition des rats au B(a)P par inhalation (ATSDR, 1995).

L'excrétion urinaire des métabolites du B(a)P est la même après exposition par voie orale, cutanée et intraveineuse chez le rat, et ceci pour 4 doses différentes du B(a)P (Bouchard et Viau, 1997).

II.5.5. Exposition au B(a)P et risque du cancer de la prostate

Le risque de cancer de la prostate est associé à l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ce risque augmente chez les groupes professionnels ayant une exposition potentielle aux HAP (Parent et al., 2009 ; Freitas et al., 2013). Par exemple, un risque accru de cancer de la prostate a été rapporté chez les pompiers qui sont systématiquement exposés à des niveaux élevés de HAP au cours de l'extinction des incendies (Ouyang et al., 2012).

Les émissions des moteurs diesel peuvent induire des changements dans les activités enzymatiques dans les prostates des animaux. Le B(a)P, par son effet oestrogénique, peut également favoriser la croissance des cellules cancéreuses prostatiques (Parent et al., 2009).

La relation entre le tabagisme et le cancer de la prostate a été largement étudiée. Les fumeurs ayant exposés ou ayant d'autres facteurs de risque sont plus susceptibles au cancer de la prostate. Par exemple, Mao et al. (Mao et al., 2004) ont révélé que les fumeurs possédant des glutathion s-transférases avec un génotype qui confère une faible activité enzymatique possèdent un risque plus élevé de cancer de la prostate.

Les études réalisées sur les jumeaux montraient que jusqu'à 50 % des cas de cancer de la prostate sont dus également à l'alimentation tels que la consommation de la viande et les graisses cuites à haute température qui représente une source importante d'AHP (Gross et al., 2005 ; Sinha et al., 2009).

III. La propolis

III.1. Introduction

La propolis est un composé naturel synthétisé par les abeilles à partir de produits collectés des bourgeons des arbres, des résines, des gommes, des mucilages et beaucoup d'autres composés (Figure 11), et retravaillé par leurs sécrétions salivaires et mandibulaires (notamment des enzymes). Ajoutée à la cire sécrétée par les abeilles, le tout forme une sorte de mastic.

Le mot propolis dérive du Grec ancien (pro, « à l'entrée de » et polis, « ville ») indiquant que ce produit naturel est utilisé dans la défense de la ruche. En raison de ses propriétés, les abeilles l'utilisent comme ciment pour maintenir la stabilité de l'humidité et de la température dans la ruche toute l'année et pour sceller les fissures et les espaces ouverts. A fortes températures, la propolis est souple, pliable et très collante. Cependant, elle devient dure et fragile lorsqu'elle est refroidie (Sforcin, 2016).



Fig.11 Collecte et fabrication de la propolis par les ouvrières butineuses (Simone-Finstrom et Spivak, 2010).

La composition de la propolis dépend de la source végétale utilisée par les abeilles : généralement, les peupliers dans les zones tempérées, *Betula* dans le Nord, *Dalechampia* et *Xanthorrhoea* en Australie (Burdock, 1998). L'hétérogénéité chimique de la propolis est donc facilement compréhensible puisqu'il s'agit d'un mélange complexe de composés dérivés de différentes plantes et traité par les enzymes salivaires des abeilles. Ainsi, la composition de la propolis dépend des plantes, de la saison de collecte et des espèces d'abeilles. Cette diversité

chimique apporte une question cruciale sur la normalisation, même si les abeilles, elles même, ne changent pas leur composition chimique (Bankova et al., 2000).

III.2. Composition brute de la propolis

L'analyse d'échantillons de propolis provenant de diverses parties du monde a montré que la propolis contient plus de 300 composés chimiques différents (Huang et al., 2014). La propolis brute est généralement composée de 50 % de résines végétales, 30 % de cires, 10 % d'huiles essentielles et aromatiques, 5 % de pollen et 5 % d'autres substances organiques (Bankova, 2005a). Grâce à diverses techniques analytiques, comme la spectrométrie de masse, la RMN, la CG/SM, il est devenu possible d'identifier plusieurs familles de composés chimiquement actifs (Bankova, 2005b).

Les principaux groupes chimiques présents dans la propolis sont les acides phénoliques et leurs esters, les flavonoïdes, les terpènes, les aldéhydes aromatiques et les alcools, les acides gras, les stilbènes et les β -stéroïdes (Watanabe, 2011). Les molécules citées entrant dans la composition des différentes propolis sont indiquées sur la figure 12.

Les flavonoïdes sont les composés de la propolis responsables des principaux effets pharmacologiques. Parmi eux, on peut citer les flavones (lutéoline), les flavonols (quercétine et dérivés), les flavanones (pinocembrine et dérivés et naringénine), les flavanonols (garbanzol et alnustinol), les chalcones et dihydrochalcones, les isoflavones (calycosine), les isodihydroflavones (daidzéine), les isoflavanes (vestitol et dérivés) et les néoflavonoïdes (médicarpine) (Bankova, 2005b).

Les terpenoïdes représentent 10 % et sont responsables de l'odeur de la propolis étant donné qu'ils sont des composés volatils, mais contribuent aussi aux propriétés biologiques de la propolis. Les composés phénoliques comprennent divers acides tel l'acide cinnamique, p-coumarique, chicorique et caféique (Bankova, 2005b). Cette composition dépend de la zone géographique de collection. On distingue la propolis de l'Europe, de l'Amérique du Nord, la propolis méditerranéenne, Africaine et tropicale (Tableau 1). Pour une revue exhaustive sur la composition des différentes propolis et leurs fonctions biologiques, se référer à Zabaïou et al. (2017) (Article annexe 1).

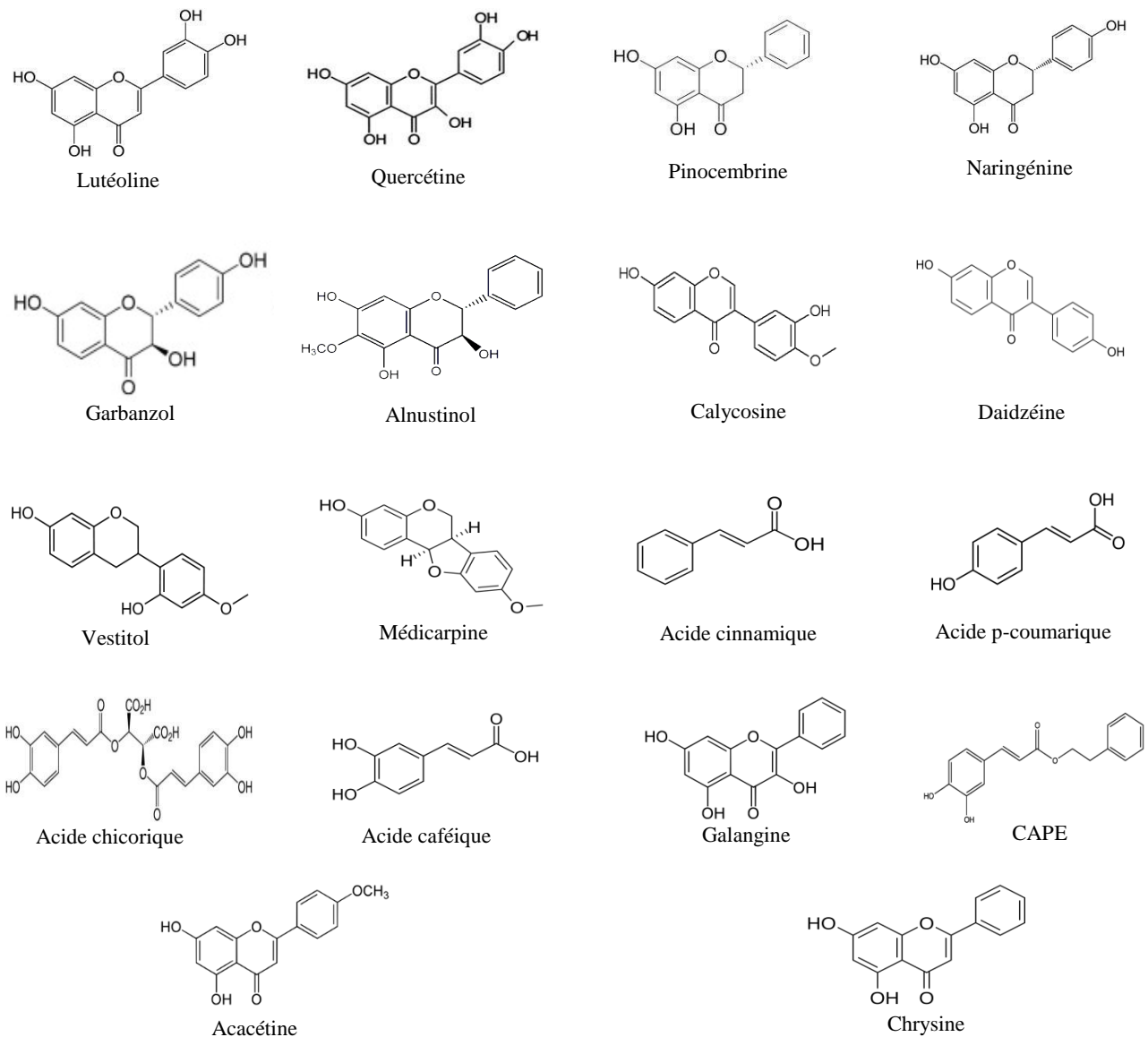


Fig.12 Structure chimique des molécules citées entrant dans la composition des différents propolis.

III.3. Propriétés biologiques de la propolis

L'utilisation de différents solvants pour l'extraction des molécules, modifie l'activité des principaux constituants biologiquement actifs dans la propolis. De nombreuses propriétés ont été associées à la propolis (Figure 13).

Tableau 1. Les principales caractéristiques de la propolis (Zabaiou et al., 2017).

Geographical origin	Major compounds	Biological properties	Reference
Temperate zones Poplar propolis	flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, quercetin, chrysin, galangin), phenolic acids and esters	-	Falcão et al., 2010 Sun et al., 2012
Algeria	diterpenic acids, chrysin, aromatic acids pinocembrin, chicoric, caffeic acids and esters, galangin	Antiproliferation Anti UV Antimetastasis	Piccinelli et al., 2013 Boutabet et al., 2011 Segueni et al., 2011 Benguedouar et al., 2016
Brazil (red and green)	prenylated phenylpropanoids, caffeoyl quinic acids, phenolic acids, p-coumaric acids, diterpenic acids, kaempferide, isosakuranetin, formononetin, isoliquiritigenin, biochanin A, apigenin	Antibacteria Antifungus Antioxidant Antiinflammation Antiangiogenic effects Antitumoral Cholesterol homeostasis Depression Anxiety Alzheimer's disease	Bankova et al., 2000 Bankova, 2005 Frezza et al., 2013 Park et al., 2002 da Silva Frezza et al., 2016 Silva et al., 2008 Alencar et al., 2007 de Mendonça et al., 2015 Machado et al., 2016 Righi et al., 2011 Bazo et al., 2002 Li et al., 2007 Iio et al., 2012 Reis et al., 2014 da Silveira et al., 2016
China	-	Alzheimer's disease	Chen et al., 2008
Cuba (red)	-	Antioxidant	Claus et al., 2000
Egypt	-	Antioxidant Antiproliferative	Salim et al., 2015
Greece	Flavonoids, diterpenic acids		Popova et al., 2010 Celekli et al., 2013
Iran	-	Cytotoxic effects on cancer cells Inhibition of cancer cell proliferation	Amini-Sarteshnizi et al., 2015 Alizadeh et al., 2015
Kenya, Cameroon, Congo, Ethiopia	Triterpenoids	Antibacteria Antifungus	Papachroni et al., 2015 Petrova et al., 2010 Popova et al., 2013 Rushdi et al., 2014
Korean		Depression	Lee et al., 2013
Malta	Terpenoids		Popova et al., 2011
Poland		Inhibition of cancer cell proliferation	Kubina et al., 2015
Portugal	-	Free radical scavenging Anti-lipid peroxidation	Miguel et al., 2010 Valente et al., 2011
Switzerland	Terpenoids		Bankova et al., 2002
Thailand		Antiproliferation	Khacha-ananda et al., 2013
Turkey	Terpenoids	Cytotoxic effects on cancer cells Antioxidant	Duran et al., 2011 Silici et al., 2007 Turan et al., 2015 Barlak et al., 2011

III.3.1. Modulation du système immunitaire

L'extrait aqueux de la propolis module l'activité antitumorale des macrophages chez les souris, et augmente la production des facteurs d'activation des lymphocytes (Orsolić et al., 2004). L'extrait éthanolique de la propolis brésilienne augmente l'activité des cellules NK contre le lymphome chez les rats (Sforcin, 2007). Orsatti et al. (Orsatti et al., 2010) ont montré que l'extrait éthanolique de la propolis verte brésilienne régule l'expression des deux récepteurs TLR-2 et TLR-4 ainsi que la production de l'interleukine (IL)-1 β chez les souris BALB/C après 3 jours de traitement. La propolis brésilienne module aussi l'action des macrophages en éliminant les parasites de *Leishmania braziliensis*. Elle augmente aussi la production de TNF α chez les souris prétraitées (da Silva et al., 2013). L'extrait aqueux de la propolis induit la production d'IL-1 *in vitro* par les macrophages péritonéaux (Dimov et al., 1992). Sampietro et al. (Sampietro et al., 2016) ont montré que la propolis partiellement purifiée stimule l'activité chimiotactique des neutrophiles à différentes concentrations ce qui peut être utile pour les patients atteints d'un dysfonctionnement de ces cellules.

III.3.2. Effet antibactérien et antifongique

En utilisant l'extrait éthanolique de la propolis du Kenya, Muli et Maingi (Muli et Maingi, 2007) ont montré la présence de différences significatives dans les activités antibactériennes de la propolis de trois régions différentes sur les microorganismes étudiés (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) après 24h de traitement. L'extrait éthanolique de la propolis brésilienne produite par deux espèces d'abeilles, *Apis mellifera* et *Apis melipona* ou abeilles sans dard, a montré un effet significatif contre *S. aureus*, *E. coli* et *Enterococcus sp.* En utilisant la méthode de diffusion sur disque, Rahman et al. (Rahman et al., 2010) ont évalué l'activité antibactérienne de la propolis canadienne contre *S. aureus* et *E. coli*. Les résultats montraient que *S. aureus* est plus sensible à la propolis que *E. coli*.

L'extrait de la propolis possède aussi un effet antifongique potentiel. Les flavonoïdes de Maringa (Brésil) induisent la mort cellulaire de trois espèces de levures à la concentration de 20 μ g/ml : *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida albicans* (Oliveira et al., 2006).

Dota et al. (Dota et al., 2011) ont aussi démontré qu'une candidose vulvovaginale pouvait être inhibée par l'extrait éthanolique et les microparticules de cette propolis brésilienne.

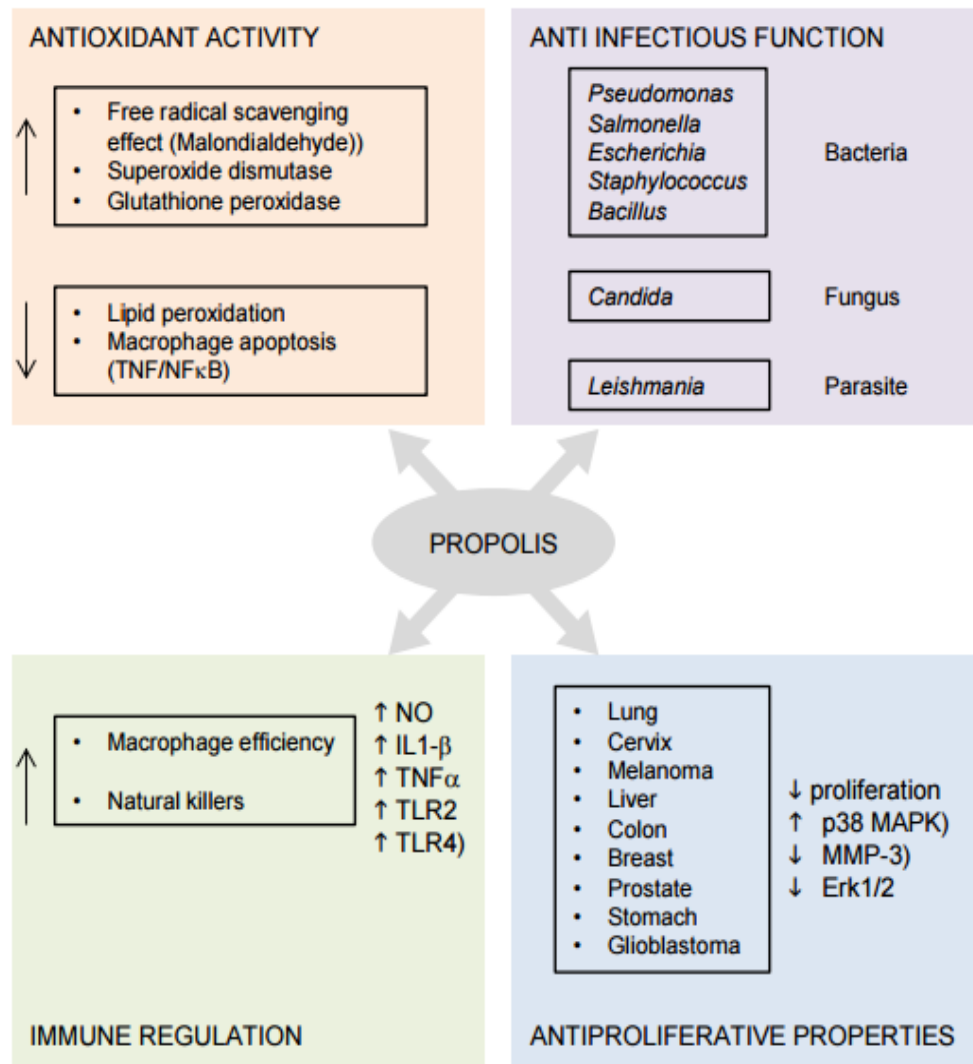


Fig.13 Représentation schématique des activités de la propolis (Zabaiou et al. 2017).

III.3.3. Effet antioxydant

L'activité antioxydante de la propolis est due à sa richesse en polyphénols, comme les acides phénoliques et les flavonoïdes.

Dans un modèle de lésions hépatiques induites par l'alcool, la propolis rouge de Cuba semble avoir des effets protectifs à travers l'inhibition de l'apoptose des macrophages et la modulation de la voie du TNF/NFκB (Claus et al., 2000). La propolis portugaise collectée de 13 régions différentes pendant l'hiver et le printemps est riche en phénols et possède une très

forte capacité de piégeage des radicaux libres (Miguel et al., 2010). L'activité antioxydante de la propolis de Bornes (Nord-Est) et de Fundão (Centre) au Portugal a été aussi étudiée. Sa capacité de piégeage des radicaux libres et de protection contre la peroxydation lipidique a été évaluée dans les érythrocytes humains (Valente et al., 2011). L'effet antioxydant de l'extrait éthanolique de la propolis rouge a été étudié sur les lignées cellulaires tumorales humaines SF-295 (glioblastome), OVCAR-8 (ovaire) et HCt-116 (colon). Sa richesse en tanins, catechines, chalcones, aures, flavonones, flavonols, xanthones, triterpénoïdes pentacycliques et guttiferones lui contribue son fort pouvoir anti-radicalaire contre le DPPH (Alencar et al., 2007 ; de Mendonça et al., 2015). La propolis rouge de la région Nord du Brésil possède l'activité antioxydante la plus puissante par rapport aux propolis vertes et marrons (Machado et al., 2016). L'extrait éthanolique de la propolis jaune brésilienne provoque une diminution de la production de l'oxyde d'azote et du malondialdéhyde chez les rats Wistar sans pour autant affecter les activités des enzymes antioxydantes superoxyde dismutase et catalase (da Silva et al., 2016).

III.3.4. Effet antiprolifératif

Le cancer est actuellement considéré comme étant la première cause de décès dans le monde (Jemal et al., 2008). Chaque année, l'industrie pharmaceutique investie des milliards de dollars dans la découverte et le développement de nouvelles molécules et approches thérapeutiques. En effet, on estime que plus de 70 % des médicaments anticancéreux sont des composés naturels ou dérivés. C'est le cas par exemple du taxol (paclitaxel) dérivé de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) ou du mandragore américain (*Podophyllum peltatum*) (Watanabe et al., 2011 ; de Weger et al., 2014).

Basé sur sa forte concentration en flavonoïdes, terpénoïdes et en composés phénoliques, la propolis a été l'objet de plusieurs études pour la mise en évidence des effets cytotoxiques et antiprolifératifs sur divers modèles *in vivo* et *in vitro*.

La propolis collectée de Phayao en Thaïlande possède un effet antiprolifératif significatif évalué par le test MTT sur des cellules d'adénocarcinome alvéolaire humain (A549) et les cellules épithéliales humaines du carcinome cervical (HeLa) après 24 h, 48 h et 72 h de traitement en fonction de la dose (Khacha-ananda et al., 2013).

L'analyse chimique de la propolis algérienne a montré la présence de divers composés à effet antiprolifératif comme la galangine (Boutabet et al., 2011) et l'acide (+)-chicorique, identifié pour la première fois dans la propolis par Segueni et al. (Segueni et al., 2011). La galangine induit l'apoptose des cellules du mélanome via l'activation de p38 MAPK (Zhang et al., 2013b) et inhibe la croissance tumorale et les métastases *in vivo* dans un modèle murin de mélanome (Zhang et al., 2013c). La galangine réduit aussi la progression et la dissémination des tumeurs de mélanome et induit l'autophagie et l'apoptose (Benguedouar et al., 2016).

L'acide chicorique exerce une très forte activité inhibitrice des MMP-3 *in vitro* à une IC50 = $6,3 \cdot 10^{-7}$ M. De plus, l'acide caféique et l'acide méthyle ester (+)-chicorique présents dans la propolis algérienne inhibent la régulation de la MMP-3 par les fibroblastes (Segueni et al., 2011).

En Turquie, 5 lignées cellulaires humaines de cancer ont été étudiées. L'extrait éthanolique de la propolis possède un effet cytotoxique très puissant contre les cellules HepG2 (carcinome hépatocellulaire), Widr (adénocarcinome du colon), HeLa, MCF-7 (adénocarcinome mammaire) et PC-3 (adénocarcinome prostatique). Il paraît que l'effet cytotoxique le plus élevé est celui exercé sur les cellules PC-3 avec une IC50 égale à $20,7 \pm 3,4$ µg/ml (Turan et al., 2015). Pareillement, l'extrait éthanolique de la propolis polonaise inhibe la prolifération des cellules tumorales humaines du mélanome (Me45) et du cancer colorectal (HCT 116) (Kubina et al., 2015).

III.3.4.1. Effet de la propolis sur le cancer de la prostate

Comme pour les autres types de cancer, la propolis a été aussi étudiée pour son effet sur la prolifération des cellules tumorales prostatiques. Au Brésil, Li et al. (Li et al., 2007) ont montré que l'extrait éthanolique de la propolis possède un effet antitumoral contre les lignées cellulaires du cancer de la prostate DU-145 et PC-3. Cette cytotoxicité est due à la régulation de l'expression des cyclines D1, B1 et de la protéine p21.

Les extraits aqueux de la propolis turque possèdent un pouvoir antioxydant très élevé. Selon Barlak et al. (Barlak et al., 2011), ce pouvoir est responsable de son activité antiproliférative sur les cellules PC-3. L'extrait éthanolique de la propolis égyptienne montre aussi un grand effet antioxydant et antiprolifératif sur ces mêmes cellules à travers l'activation de l'apoptose par l'induction de la transcription des protéines p53 et Bax (Salim et al., 2015). L'effet de cet

extrait est plus puissant que la doxorubicine. Szliszka et al. (Szliszka et al., 2011a) ont montré que l'un des mécanismes impliqués dans cet effet cytotoxique est l'activation de l'apoptose via l'activation du ligand TRAIL dans les cellules LNCaP et DU-145 et qui peut présenter une cible thérapeutique excellente sachant que plus de 50 % des cellules tumorales sont résistantes au TRAIL aux différents niveaux des voies de signalisation (Zhang et al., 2013a).

Parmi les différents composés présents dans l'extrait éthanolique, les principales molécules responsables de ces effets sont les flavonoïdes et les phényles ester de l'acide caféique (CAPE). De nombreuses études s'intéressaient à leurs effets et les mécanismes par lesquels ils peuvent intervenir (Rosenberg Zand et al., 2002).

L'acacétine (5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone) possède un effet antimétastatique contre les cellules DU-145 (Shen et al., 2010). Les métastases sont liées à la production des protéines matricielles dans une variété de cellules ou de tissus qu'elles entourent (Nam et al., 2016). L'acacétine inhibe l'adhésion, l'invasion et la migration. Elle peut aussi bloquer la phosphorylation de la p38 MAPK qui est impliquée dans la régulation négative des métalloprotéinases matricielles (MMP)-2 et -9 et l'u-PA (*urokinase-type plasminogen activator*) aux niveaux transcriptionnels et protéiques. L'acacétine réduit aussi les niveaux nucléaires du facteur NFκB et des proto-oncogènes c-Fos et c-Jun (Shen et al., 2010).

La chryisine (5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromène-4-one) est une flavone connu comme étant un inhibiteur puissant de l'aromatase, qui est une enzyme responsable d'une étape clé dans la biosynthèse des estrogènes (Sanderson et al., 2004). Samarghandian et al. (Samarghandian et al., 2011) montraient que la chryisine diminue la prolifération et induit l'apoptose dans les cellules PC-3.

Quelques flavonoïdes agissent sur le cycle cellulaire. Par exemple, la génestéine arrête le cycle cellulaire au niveau de la phase G2/M en inhibant l'expression de cycline B et l'induction de p21 d'une façon indépendante de p53 (Kobayashi et al., 2002).

La quercétine aussi est un flavonoïde très important. Lorsqu'elle est utilisée aux concentrations de 25 et 50 µM, elle inhibe significativement la croissance des cellules PC-3 et DU-145 (Nair et al., 2004). Selon les auteurs, cela est dû à l'inhibition de l'expression des oncogènes qui contrôlent les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. La pinocembrine (5,7-dihydroxyflavone) exerce un effet cytotoxique sur la survie cellulaire des cellules LNCaP, DU-145 et PC-3. Elle induit l'apoptose des cellules LNCaP et provoque un arrêt du cycle

cellulaire au niveau des phases S et G2/M. elle est aussi impliquée dans la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial avant d'aboutir à l'apoptose des cellules LNCaP (Chen et al., 2013).

La pinocembrine possède aussi une activité d'inhibition de la 5 α -réductase (Komoda, 1989) et réduit donc les niveaux de 5 α -dihydrotestostérone (DHT), un androgène puissant de la croissance épithéliale prostatique.

Le CAPE est aussi l'un des plus puissants acides phénoliques de la propolis. A travers l'inhibition de la protéine ribosomale S6 kinase beta-1 (p70S6K), qui est un intermédiaire responsable de la synthèse des protéines dans la voie PI3K/AKT, le CAPE bloque la prolifération des cellules LNCaP, DU-145 et PC-3 et réduit la croissance tumorale des xénogreffes LNCaP (Chuu et al., 2012 ; Lin et al., 2012). Le CAPE peut aussi agir par l'induction de l'apoptose. En agissant d'une manière dose dépendante, le CAPE réduit l'expression des inhibiteurs de l'apoptose : cTAP-1, cTAP-2 et XIAP (McEleny et al., 2004).

L'hormonothérapie est l'une des approches utilisées pour traiter le cancer de la prostate. Cette thérapie consiste à bloquer la signalisation du récepteur des androgènes (AR). Quatre flavonoïdes de la propolis (myricétine, quercétine, fisétine et kaempferol) ont été étudiés pour leurs effets chimiopréventifs contre les cancers de la prostate résistants et sensibles à la castration. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets : l'inhibition de la 5 α -réductase, la compétition directe avec les androgènes pour les sites de liaison de AR, la perturbation des interactions de AR avec les co-régulateurs et la modulation de la voie PI3K/AKT (Boam, 2015).

III.4. Utilisation de la propolis comme adjuvant dans la thérapie du cancer

L'objectif du traitement adjuvant est d'améliorer les symptômes spécifiques de la maladie et la survie globale. Par conséquent, la propolis a été démontrée pour potentialiser les chimiothérapies et pour atténuer leurs effets indésirables (Patel, 2016). Par exemple, lorsque l'aldo-céto réductase AKR1B10, qui métabolise les aldéhydes et les médicaments contenant des groupes carbonyle, est fortement accumulée, elle induit une inflammation et une tumorigenèse en réduisant les effets de la chimiothérapie. Le CAPE s'est révélé être un inhibiteur efficace de l'enzyme AKR1B10 et devrait augmenter l'efficacité du traitement (Soda et al., 2012).

La doxorubicine, qui interagit avec l'ADN par l'intercalation et l'inhibition de la biosynthèse macromoléculaire, est couramment utilisée pour traiter la leucémie et le lymphome de Hodgkin, ainsi que d'autres cancers, comme la vessie, le sein, l'estomac, les poumons et les ovaires. Cependant, les effets secondaires sont nombreux, comme l'induction de la toxicité testiculaire et donc la stérilité. Dans le modèle de rat, la propolis co-administrée avec de la doxorubicine empêche l'effet néfaste sur les testicules (Rizk et al., 2014). De même, la propolis portugaise a été démontrée pour renforcer l'effet du paclitaxel dans les cellules MDA-MB-231 résistantes aux œstrogènes et les cellules DU145 résistantes aux androgènes (Silva-Carvalho et al., 2014). TRAIL déclenche une mort des cellules cancéreuses, mais les tumeurs hautement malignes sont souvent résistantes à l'induction de l'apoptose par TRAIL et certaines cellules cancéreuses qui étaient initialement sensibles à l'apoptose induite par TRAIL peuvent devenir résistantes après une exposition répétée (Trivedi et Mishra, 2015). De manière intéressante, les composés bioactifs de la propolis verte brésilienne aident à la chimioprévention du cancer de la prostate grâce à l'amélioration de l'apoptose médiée par TRAIL (Szliszka et al., 2011b). Ces quelques exemples parmi nombreux soulignent clairement que, outre le potentiel de la propolis utilisé comme agent thérapeutique, sa co-administration avec un traitement déjà amélioré est un domaine d'investigation intéressant, car il augmentera l'efficacité de la chimiothérapie et protégera des effets secondaires délétères.

Partie
expérimentale

I. Le stress oxydatif dans l'hypertrophie bénigne de la prostate

Le cancer de la prostate et l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) sont des problèmes de santé importants qui deviennent de plus en plus répandus, en relation avec le vieillissement progressif de la population.

Le cancer de la prostate est la deuxième cause de décès par cancer chez les hommes après le cancer du poumon. L'HBP représente la maladie urologique la plus fréquente chez les hommes, touchant environ le quart des hommes dans leurs 50 ans, un tiers dans leurs 60 ans et environ la moitié des hommes octogénaires (De Nunzio et al., 2011).

L'HBP et le cancer de la prostate se forment dans différentes zones de la prostate. L'HBP se développe au niveau de la zone de transition et la zone centrale de la prostate alors que le cancer se développe à partir de la zone périphérique. Seulement dans 20% des cas ils coexistent dans la même zone (De Nunzio et al., 2011).

L'HBP et le cancer de la prostate sont considérés comme des maladies chroniques avec initiation précoce et progression lente. L'HBP commence comme une simple hyperplasie micronodulaire évoluant vers un élargissement nodulaire macroscopique qui se traduit progressivement par une entité clinique. De même, le cancer de la prostate se développe grâce à de modifications histologiques précancéreuses précoces et tardives (Sciarra et al., 2007).

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'étiologie de la phase pathologique de l'HBP. Les théories principales incluent les hypothèses selon lesquelles l'HBP pathologique est due à : 1) un changement dans le métabolisme des androgènes qui se produit avec l'âge et qui conduit à une accumulation anormale de la dihydrotestostérone, ce qui conduit à une augmentation de la taille de la prostate, 2) un changement au niveau des interactions épithélium-stroma qui se produit avec l'âge et qui a un effet sur la croissance prostatique (théorie du réveil embryonnaire) et, 3) une augmentation du nombre total des cellules souches prostatiques et/ou une augmentation de l'expansion clonale des cellules souches en cellules d'amplification et de transit se produisant avec le vieillissement (théorie des cellules souches) (Isaacs et Coffey, 1989).

Le stress oxydatif est aussi l'un des mécanismes suggérés comme étant l'une des causes du développement de l'HBP (Udensi et Tchounwou, 2016).

Les dommages oxydatifs peuvent être exacerbés par une diminution de l'efficacité des mécanismes de défense antioxydants (Minciullo et al., 2015). L'HBP est une maladie associée à l'âge. Il a été rapporté que l'âge augmente l'équilibre pro-oxydant/anti-oxydant vers un état plus oxydatif dans de nombreux tissus (Udensi et Tchounwou, 2016).

Notre projet de recherche a consisté à étudier l'étiologie et la physiopathologie de l'HBP liée au stress oxydatif. Pour cela nous avons réalisé une étude clinique et une étude *in vivo* sur les rats Wistar.

I.1. Matériels et Méthodes

I.1.1. Etude clinique

L'étude clinique a été réalisée en collaboration avec le service d'urologie de l'hôpital Mohammed Seddik Benyahya de Jijel. C'est une suite du travail que j'ai réalisé au cours du magistère. Les pièces opératoires étudiées au nombre de 29 sont des HBP obtenues par adénomectomie transvésicale et sur lesquels différents paramètres visant à étudier le stress oxydatif ont été évalués.

Les paramètres étudiés sont la mesure des taux du MDA et du glutathion cytosoliques et des activités enzymatiques de 4 enzymes antioxydantes qui sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion S-transférase et la glutathion peroxydase. Les méthodes utilisées et les protocoles opératoires utilisés sont plus détaillés dans l'article en annexe 2 (Zabaiou et al., 2015).

I.1.2. Etude *in vivo*

I.1.2.1. Entretien des animaux et induction de l'HBP

24 rats Wistar de 200 g environ obtenus de l'institut Pasteur d'Alger sont placés dans des cages en plastiques en raison de 6 rats par cage en présence d'un accès libre à l'aliment et à l'eau. Pour l'induction de l'HBP nous avons administré à ces rats 7,5 mg/kg de testostérone par voie intramusculaire (El-Said El-Mehi et Mohamed El-Sherif, 2015). Nous avons réalisé 4 sacrifices, le premier le jour du traitement, puis après 8 semaines de traitement, ensuite 16 semaines puis après 24 semaines, par dislocation cervicale sous anesthésie. La prostate

ventrale a été récupérée par la suite pour l'étude histologique (conservation dans le formol) et pour l'étude du stress oxydatif.

I.1.2.2. Extraction de la fraction cytosolique

La prostate a été rincée au PBS puis broyée en présence du tampon de lyse 1v/3v (50 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 1% triton x100 ; 5 mM EDTA ; 0,1% SDS ; 10% glycérol ; 10 mM PMSF ; pH 7,4), ensuite centrifugée (14000 g/15 min à 4°C). Le surnageant est récupéré et sa concentration en protéines est évaluée par la méthode de Bradford.

I.1.2.3. Dosage du glutathion (GSH)

Pour le dosage du GSH, 100 µl de la fraction cytosolique sont ajoutés à 900 µl de tampon phosphate et 1 ml de TCA 5% puis incubés à 4°C pendant 1 h. Après incubation, le mélange est centrifugé à 1200 g/ 15 min à 4°C. 400 µl du surnageant sont ensuite rajoutés à 2,2 ml de tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,1 M) et 800 µl de DTNB (10 mM). Après incubation pendant 10 min, la lecture de l'absorbance est faite à 412 nm (Jollow et al., 1974).

I.1.2.4. Dosage du MDA

Il a été effectué en utilisant la méthode d'Okhawa et al., 1979 légèrement modifiée. 200 µl de la fraction cytosolique sont ajoutés à 0,4 ml de TBA (0,67%) et 1 ml de TCA 20 % puis mélangés et incubés à 100 °C pendant 10 min. Après refroidissement, 1,6 ml de n-butanol sont ajoutés et le tout est centrifugé à 2500 rpm/10 min et l'absorbance est mesurée à 532 nm.

I.1.2.5. Evaluation des activités enzymatiques antioxydantes

a. Activité de la superoxyde dismutase (SOD)

5 µl de la fraction cytosolique sont additionnés à 2 ml du milieu réactionnel (cyanide de sodium 10^{-2} M ; NBT $1,76 \cdot 10^{-4}$ M ; EDTA $66 \cdot 10^{-3}$ M ; riboflavine $2 \cdot 10^{-6}$ M). 0,1 ml de méthionine (10^{-2} M) sont ensuite ajoutés et le mélange est irradié avec une lampe de 15 w pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 560 nm. La SOD est exprimée en UI/g de protéine. Une unité de l'activité de la SOD est définie en tant que la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50 %.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

SOD UI/g protéines = % d'inhibition x 6,35/ protéines (Beauchamp & Fridovich 1971).

b. Activité de la glutathion S-transférase (GST)

Pour l'évaluation de l'activité de la GST, 20 µl de la fraction cytosolique sont ajoutés à 830 µl de tampon phosphate (100 mM ; pH 6,5) et 100 µl GSH (10 mM). La réaction est commencée par l'ajout de 50 µl de CDNB (20 mM) et la cinétique est suivie pendant 5 min à 340 nm à 25 °C.

$$\text{GST (UI/g protéines)} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min Test} - \Delta A_{340}/\text{min Blanc}) / (Vt) (Fd)}{(9,6)}$$

Vt : volume total (en millilitres) de l'essai.

Fd : facteur de dilution.

9,6 : coefficient d'extinction millimolaire du glutathion-1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué à 340 nm.

Ve : volume en millilitre de l'enzyme utilisée (Habig et al., 1974).

I.2. Résultats

I.2.1. Etude clinique

Les tissus prostatiques étudiés ont été obtenus de patients atteints d'HBP et hospitalisés au niveau de l'hôpital Mohamed Seddik Benyahia de Jijel. Les pièces opératoires ont été divisées en 4 groupes en se référant à la taille de l'HBP estimée par rayons X : groupe 1 (n=8 ; taille : 20-40 g), groupe 2 (n=7 ; taille : 41-60 g), groupe 3 (n=7 ; taille : 61-80 g), groupe 4 (n=7 ; taille >100 g).

I.2.1.1. Variation des taux du MDA cytosolique

La figure 14 montre une augmentation des niveaux du MDA dans tous les groupes d'hypertrophie bénigne de la prostate. Cette augmentation est significative ($p < 0,05$) dans le groupe 2 et hautement significative dans les groupes 3 et 4 et c'est le reflet de la présence d'une forte peroxydation lipidique au sein de ces tissus hypertrophiques.

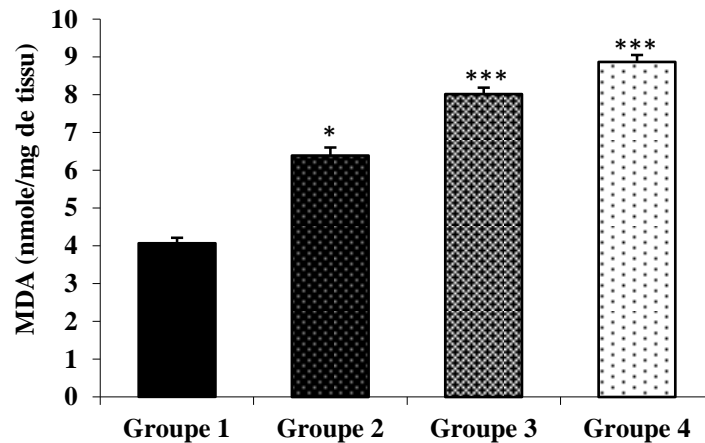


Fig.14 Variations des niveaux cytosoliques du MDA. Groupe 1 (prostate 20g-40g, $n=8$), Groupe 2 (41g-60g, $n=7$), groupe 3 (61g-80g, $n=7$) groupe 4 (prostate >100g, $n=7$). Test-*t* de Student * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

I.2.1.2. Variation des taux du Glutathion cytosolique

La mesure des taux du glutathion (Figure 15) montre que cet antioxydant est aussi lié au développement de l'HBP étant donné que ses valeurs diminuent avec le développement de la taille des tumeurs hypertrophiques (groupe 3 et 4, $p < 0,01$).

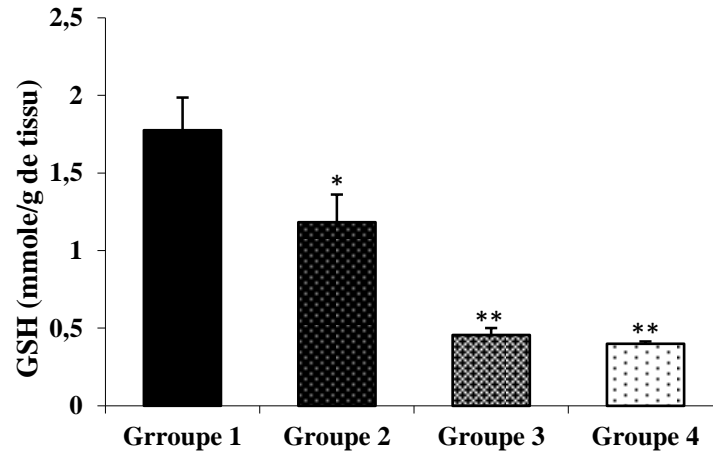
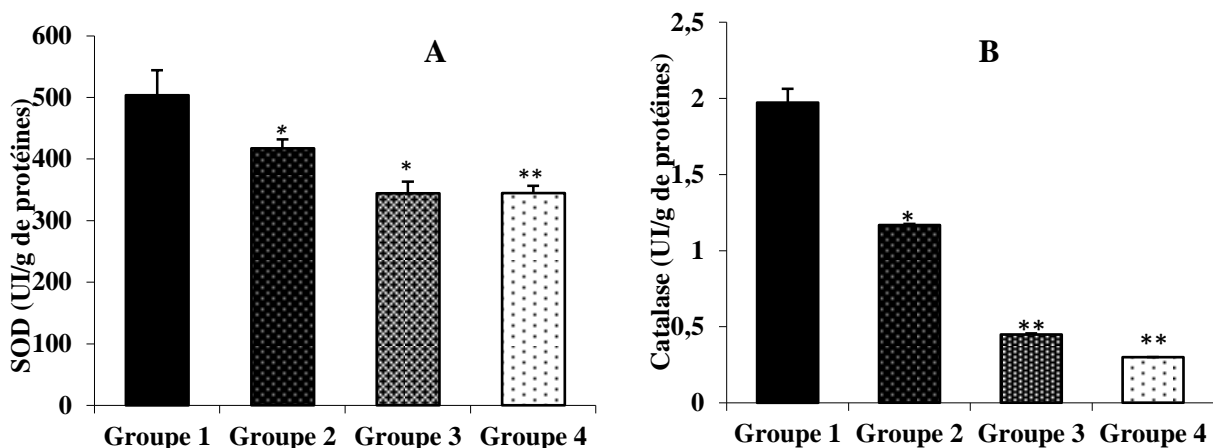


Fig.15 Variations des niveaux cytosoliques du glutathion. Groupe 1 (prostate 20g-40g, $n=8$), Groupe 2 (41g-60g, $n=7$), groupe 3 (61g-80g, $n=7$) groupe 4 (prostate >100g, $n=7$). Test- t de Student * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

I.2.1.3. Variation des activités enzymatiques antioxydantes

Les activités enzymatiques des différentes enzymes antioxydantes étudiées sont aussi altérées (Figure 16). Nous avons enregistré une diminution très significative de l'activité de la SOD et de la catalase ($p<0,01$) dans les groupes 3 et 4. Le développement de l'HBP est aussi accompagné de la diminution de l'activité de la GST. La diminution est hautement significative ($p<0,001$) dans les groupes 3 et 4 et significative ($p<0,05$) dans le deuxième groupe. L'activité de la GPx diminue d'une manière très significative ($p<0,01$).



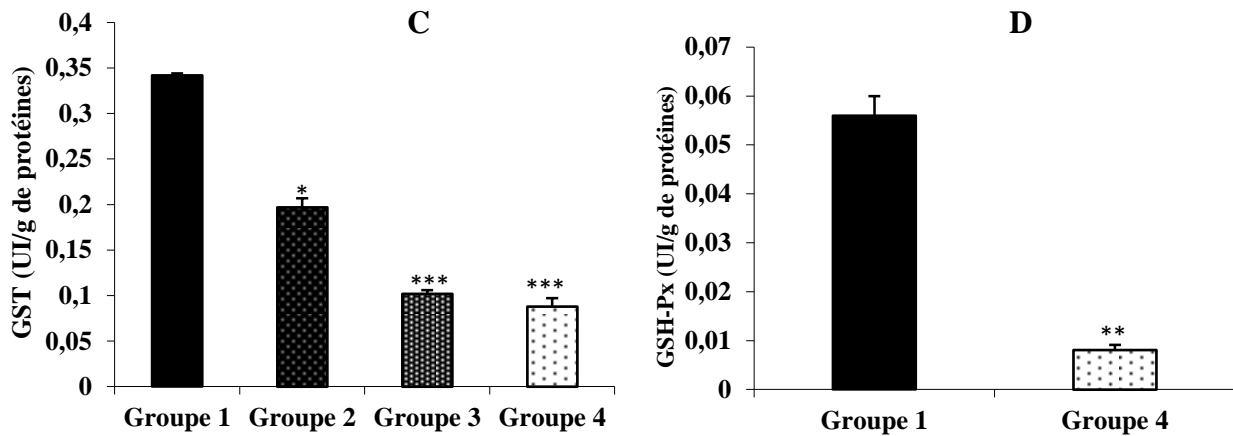


Fig.16 Variations des activités enzymatiques des enzymes antioxydantes. Groupe 1 (prostate 20g-40g, $n=8$), Groupe 2 (41g-60g, $n=7$), groupe 3 (61g-80g, $n=7$) groupe 4 (prostate >100g, $n=7$). Test- t de Student * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

I.2.2. Etude *in vivo*

Les rats du groupe A sacrifiés le jour du traitement sont considérés comme témoins. Pour suivre l'évolution de l'HBP et du stress oxydatif dans le tissu prostatique. Nous avons réalisé trois sacrifices, le premier après 8 semaines de traitement par la testostérone (groupe B), le deuxième après 16 semaines (groupe C) et le troisième après 24 semaines (groupe D).

I.2.2.1. Développement de l'HBP chez le rat Wistar

La figure 17 montre les changements histologiques de la prostate ventrale du rat Wistar après traitement par la testostérone visualisés par microscope optique après coloration hématoxyline/éosine. Après environ 16 semaines de traitement, tous les rats traités développaient une HBP. Elle est caractérisée par la présence de formes irrégulières des acini glandulaires et de projections vésicales vers la lumière.

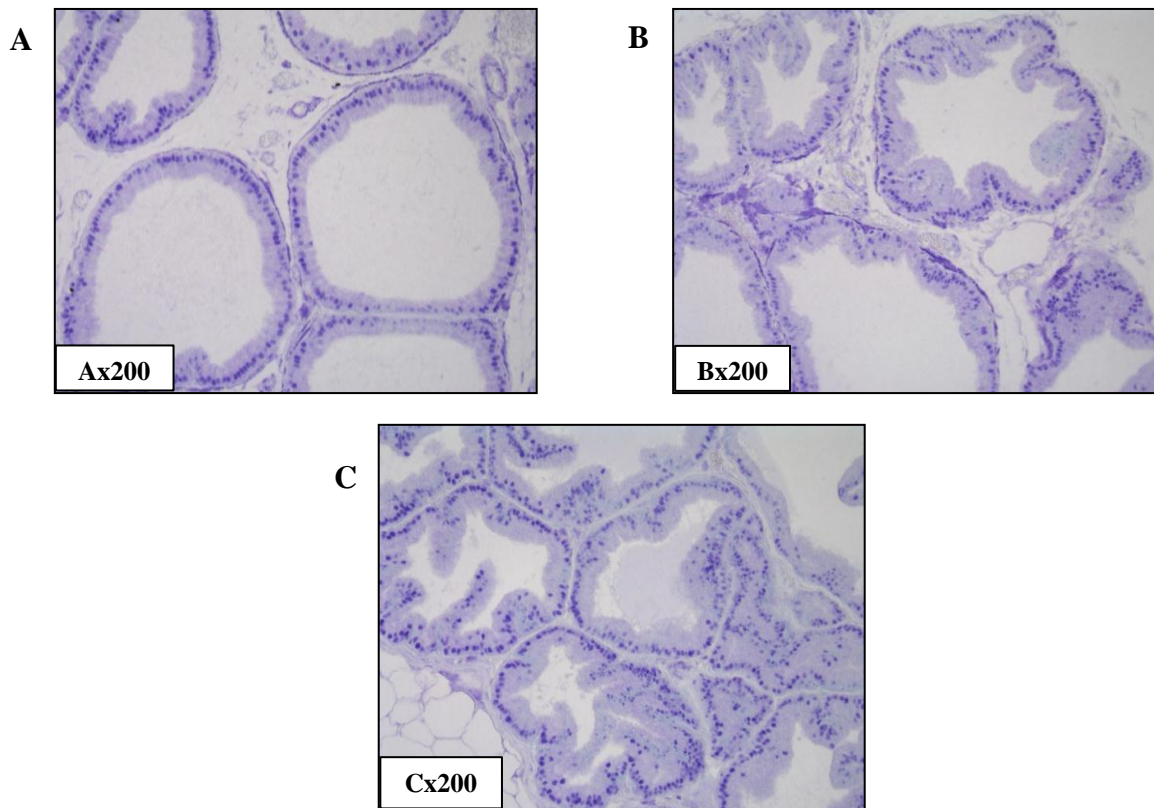


Fig.17 Modifications histologiques de la prostate ventrale induites par l'administration de la testostérone chez le rat Wistar. A) prostate ventrale après 8 semaines de traitement par la testostérone. B) HBP de la prostate ventrale induite par la testostérone (après 16 semaines de traitement), C) HBP de la prostate ventrale induite par la testostérone (après 24 semaines de traitement). Coloration H/E x200.

I.2.2.2. Variations des taux du MDA cytosolique

Tout d'abord, nous avons mesuré les taux du MDA. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 18. On remarque que les taux du MDA augmentent au fur et à mesure avec le développement de l'HBP. Au cours des deux premiers mois, une augmentation significative ($p < 0,05$) a été enregistrée malgré que sur le plan histologique, le tissu prostatique est normal et ne présente pas des modifications hypertrophiques. Les taux du MDA ne cessent d'augmenter, après 16 semaines de traitement ($12,884 \pm 1,73$ nmol/g protéines) où l'HBP est déjà installée, et 24 semaines de traitement, où une augmentation hautement significative a été enregistrée ($p < 0,001$).

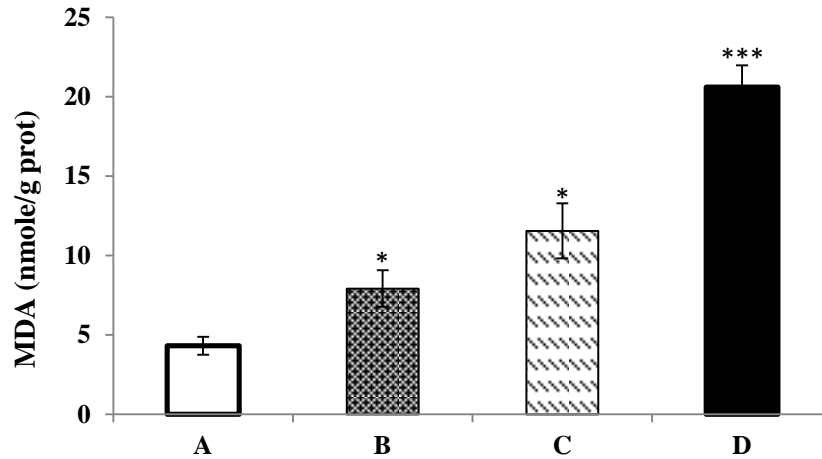


Fig.18 Variations des taux du MDA cytosolique dans les différents groupes de rats. A : Jour du traitement par la testostérone ; B : après 8 semaines de traitement ; C : après 16 semaines de traitement ; D : après 24 semaines de traitement. Test-*t* de Student * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$), $n = 6$.

I.2.2.3. Variations des niveaux du glutathion cytosolique

Les résultats du dosage du glutathion représentés par la figure 19 sont inversement corrélés à ceux du MDA.

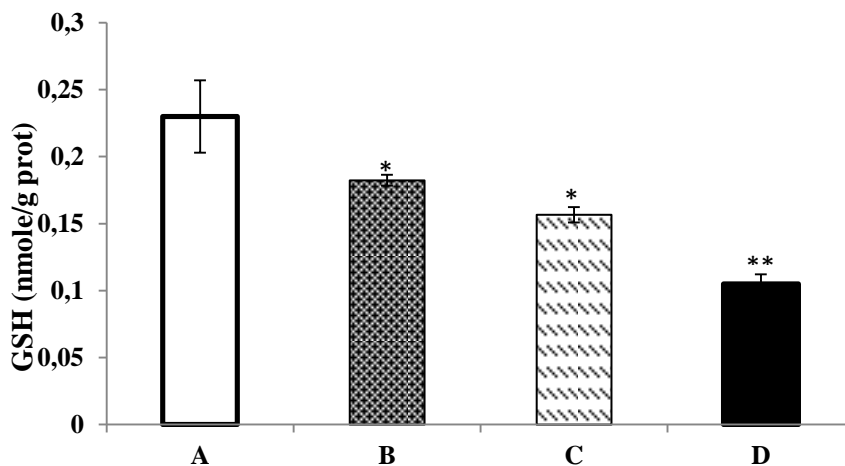


Fig.19 Variations des taux du GSH cytosolique dans les différents groupes de rats. A : Jour du traitement par la testostérone ; B : après 8 semaines de traitement ; C : après 16 semaines de traitement ; D : après 24 semaines de traitement. Test-*t* de Student. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), $n = 6$.

Au cours du développement de l'HBP induite par la testostérone, les taux du GSH cytosolique diminuent. Une diminution significative ($p < 0,05$) a été enregistrée deux mois après le traitement. Les taux continuent à diminuer où on a enregistré un taux de $0,16 \pm 0,005$ nmole/g de protéine à la 16^{ème} semaine de traitement et $0,10 \pm 0,007$ nmole/g de protéines lors du dernier sacrifice.

I.2.2.4. Variation de l'activité enzymatique antioxydante au cours du développement de l'HBP

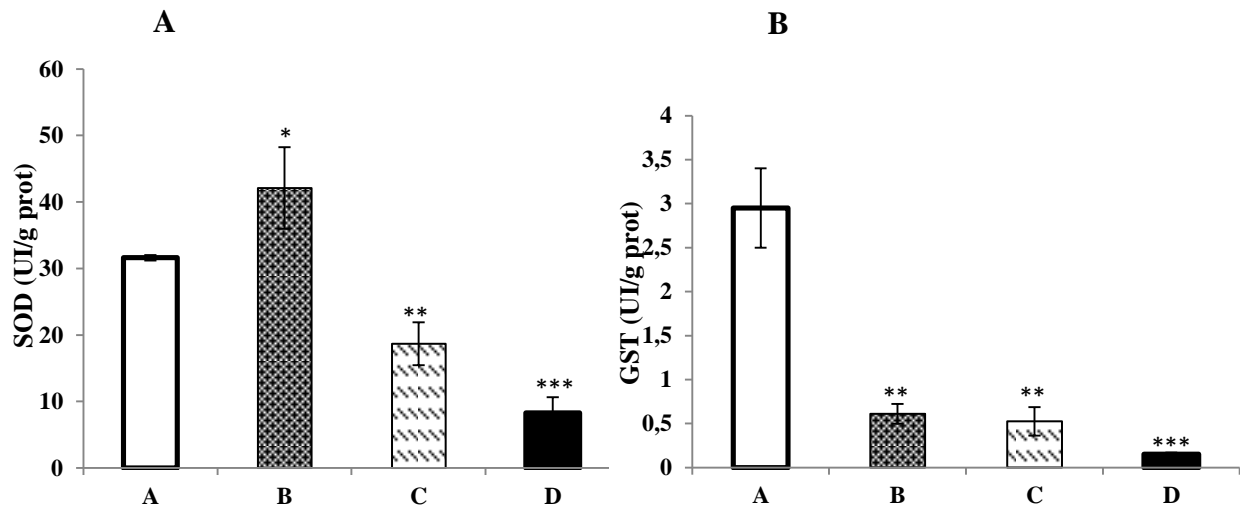


Fig.20 Variations des activités enzymatiques de la SOD et de la GST dans les différents groupes de rats. A : Jour du traitement par la testostérone ; B : après 8 semaines de traitement ; C : après 16 semaines de traitement ; D : après 24 semaines de traitement. Test-*t* de Student. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), $n = 6$.

Nous avons évalué l'activité enzymatique de deux enzymes antioxydantes, la SOD et la GST. Après deux mois de traitement par la testostérone, l'activité enzymatique de la SOD augmente de manière significative ($42,09 \pm 6,12$ UI/g de protéines) par rapport au groupe A ($31,62 \pm 0,4$ UI/g de protéines), puis diminue d'une manière très significative ($p < 0,01$) à la 16^{ème} semaine de traitement. Après 24 semaines, cette diminution est hautement significative ($8,29 \pm 1,34$ UI/g de prot) (Figure 20A).

Comme pour la SOD, l'activité de la GST diminue également. Elle passe de $2,95 \pm 0,4$ UI/g de protéines à $0,61 \pm 0,1$ UI/g de protéines après 8 semaines de traitement (Figure 20B). Elle

continue à diminuer de manière hautement significative jusqu'à atteindre une valeur de $0,15 \pm 0,01$ UI/g de protéines.

I.3. Discussion

L'HBP est la maladie non maligne la plus fréquente de la prostate chez l'homme âgé. C'est un problème majeur de santé qui atteint la qualité de vie des hommes (Patel et al., 2014). Son étiologie reste jusqu'à présent peu connue. Plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans sa physiopathologie, principalement les modifications tissulaires liées à l'âge, les altérations hormonales et métaboliques ainsi que l'inflammation (Briganti et al., 2009).

Il est bien connu actuellement que les espèces oxygénées réactives (EOR) jouent un rôle dans la pathogenèse de plusieurs maladies. Les EOR se forment naturellement au cours de nombreux processus métaboliques. Elles peuvent être générées par différentes voies cellulaires y compris la voie dépendante du calcium, la voie des tyrosines kinases MAPK, NFκB, des récepteurs des cytokines, récepteurs de croissance et récepteurs couplés à la protéine G (Noori, 2012). Pour empêcher la formation de ces EOR ou les détoxifier, les cellules ont développé plusieurs mécanismes de protection en utilisant des systèmes appelés antioxydants, qui peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques (Wu et Cederbaum, 2003).

Dans l'étude clinique, nous avons étudié l'implication du stress oxydatif dans la physiopathologie de l'HBP. Les résultats montrent que, chez les malades atteints d'HBP, la peroxydation lipidique exprimée par les niveaux de MDA cytosolique augmente. Cette augmentation est accompagnée d'une diminution des taux du glutathion GSH et des activités enzymatiques des enzymes antioxydantes.

Des hypothèses pour expliquer ces résultats sont émises et une discussion approfondie est présente dans l'article en annexe 2 et qui représente les résultats obtenus sur 24 patients atteints d'HBP et sont les mêmes que ceux obtenus sur 29 patients en ce qui concerne l'état général du stress oxydatif.

Cette étude nous a permis de montrer la présence d'une relation étroite entre le développement de l'HBP et le stress oxydatif mais sans pour autant comprendre si ce stress est la cause ou la conséquence de la maladie.

Pour répondre à cette problématique, nous avons réalisé une étude *in vivo* sur des rats Wistar albinos chez lesquels nous avons provoqué l'HBP par administration de la testostérone et le suivi du développement de la pathologie a été réalisé par l'étude histologique. Après 16 semaines de traitement, tous les rats développaient une HBP. Selon Yamashita et al. (Yamashita et al., 2003), les changements hyperplasiques de la prostate ventrale se produisent avec l'âge chez le rat Wistar. Ces modifications de la prostate ventrale sont observées aux 15^{ème} - 20^{ème} semaines. Ces observations indiquent que nous avons mis en place un bon modèle pour l'étude de l'HBP humaine (Thielen et al., 2007).

Au cours du développement de l'HBP chez ces rats, nous avons suivi les variations de l'état oxydatif au niveau de leurs prostates. Les résultats de cette étude nous ont montré qu'au cours du développement de l'HBP chez les rats Wistar sous l'effet de la testostérone, des modifications du statut oxydatif se manifestent. Une augmentation des niveaux du stress a été enregistrée ; une augmentation de la peroxydation lipidique qui se traduit par l'augmentation des niveaux du MDA, une déplétion des niveaux du GSH et la diminution des activités enzymatiques de la SOD et la GST.

Le stress oxydatif entraîne des dommages des composants cellulaires comme l'ADN, les protéines et les lipides. Pour maintenir l'homéostasie cellulaire redox, les cellules de l'organisme ont développé des systèmes de défense antioxydants. Cependant, l'augmentation de la production des espèces réactives en réponse à l'inflammation ou suite à l'inhibition des mécanismes de défense peut facilement dépasser la capacité des systèmes antioxydants (Thapa et Gosh, 2012).

La prostate est un organe vulnérable aux dommages oxydatifs de l'ADN en raison du renouvellement cellulaire plus rapide et la présence de moins d'enzymes de réparation de l'ADN (Hamid et al., 2011). Le stress oxydatif active le facteur de transcription NF- κ B à travers la voie de transduction TNF- α /AP-1 et la voie NIK (*NF- κ B Inducing kinase*). NF- κ B est le régulateur principal de la transcription inflammatoire et ses gènes cibles sont les gènes de régulation de la réponse immunitaire, de l'inflammation, de la prolifération cellulaire, de la migration cellulaire et de l'apoptose (Hamid et al., 2011). L'exposition des cellules prostatiques aux médiateurs comme les EOR, active le NF- κ B et induit une production locale de cytokines proinflammatoires (Wong et al., 2009). Au cours de l'HBP, la voie TNF- α /AP-1 est fortement activée (Hamid et al., 2011).

Les enzymes antioxydantes, incluant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR), constituent l'épine dorsale du système de défense antioxydant. Une diminution des activités enzymatiques de la SOD et de la CAT et une augmentation des niveaux des produits d'ADN ont été enregistrés dans la majorité des tissus d'HBP étudiés par Olinski et al. (Olinski et al., 1995) par rapport aux tissus sains.

Une étude réalisée par Mittal et al., (Mittal et al., 2009) a montré la présence d'une corrélation positive entre le polymorphisme de GSTM1 ou GSTT1 avec l'augmentation du risque de l'HBP.

Des études ont montré que lorsque les cellules de l'HBP sont soumises à un stress oxydatif doux en étant traitées avec de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), leur taux de prolifération augmente. Par contre, le traitement de ces cellules avec de la vitamine E et du sélénium renverse la prolifération, ce qui suggère fortement le rôle possible des antioxydants dans la prévention de l'HBP (Lonn et al., 2005).

I.4. Conclusion

Cette étude ouvre des perspectives intéressantes quant à l'utilisation d'une supplémentation avec des antioxydants et/ou la stimulation des antioxydants cellulaires pour réduire les lésions oxydatifs déjà présentes, réduire les effets négatifs d'une HBP, voire au final prévenir son développement. Des tests cliniques devront être réalisés pour démontrer que cette hypothèse est pertinente à grande échelle.

II. La propolis réduit la prolifération des cellules du cancer de la prostate induit par le benzo(a)pyrène chez les rats Wistar

Cette deuxième partie du projet de thèse a consisté à développer un modèle animal de cancer de la prostate en utilisant une molécule chimique appartenant à la famille des HAP. La molécule utilisée était le benzo(a)pyrène [B(a)P] et ce choix a été basé sur plusieurs données :

- 1) En 2012, le B(a)P a été classé dans le groupe 1 (cancérogène pour l'Homme et l'animal) par l'IARC (IARC., 2012).
- 2) Plusieurs études épidémiologiques ont montré l'existence d'une relation étroite entre la cigarette, le cancer de la prostate et l'augmentation du risque de mortalité par ce cancer (Huncharek et al., 2010 ; Kenfield et al., 2011 ; Sawada et al., 2013).
- 3) Le B(a)P est actuellement classé et considéré comme étant un perturbateur endocrinien (Roby, 2014).

Le modèle obtenu est utilisé pour étudier l'effet de l'extrait de propolis contre le cancer de la prostate.

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats de la race Wistar (Institut Pasteur d'Alger). Ce sont des rats mâles âgés de 30 jours ayant un poids moyen de 140 g. Les animaux ont été maintenus dans une animalerie à une température ambiante de 23 °C, air filtré et un cycle journalier naturel de lumière. Les rats sont installés par six en cages collectives avec un accès libre à l'eau et à la nourriture.

II.1.2. Traitement des animaux

Les rats ont été classés en 4 groupes différents. Le premier groupe est le témoin, traité par le véhicule (huile d'olive) n= 10. Le deuxième groupe a été traité avec du B(a)P (Sigma-Aldrich) dissout dans l'huile d'olive à une dose unique égale à 200 mg/kg / 0,5 ml par voie intra-péritonéale n= 30. Le troisième groupe a été traité par du B(a)P (200 mg/kg / 0,5 ml par voie intra-péritonéale) puis par la propolis (20 mg/kg, 1 ml par gavage journalier pendant 21

jours) n= 10, une fois le cancer installé. Le quatrième groupe a été traité avec de la propolis seule (20 mg/kg, 1 ml par gavage journalier pendant 21 jours) et sert de contrôle positif n= 10.

II.1.3. Extraction et préparation de la propolis

La propolis utilisée est présente sous forme de poudre jaune aromatique qu'on dissout dans l'éthanol et on dilue dans l'eau distillée. Elle a été collectée auprès des apiculteurs de la région Est de la wilaya de Jijel. Cette propolis a été purifiée par la suite et réduite en poudre par les phytochimistes au niveau du laboratoire de pharmacologie et de phytochimie de l'université de Jijel. Son mode d'extraction et sa composition détaillés sont décrits dans l'article de Boutabet et al. (Boutabet et al., 2011).

II.1.4. Sacrifice des animaux

Le premier sacrifice a été réalisé 16 semaines après traitement par le B(a)P. Les autres sacrifices après 24 semaines, 28 semaines et 31 semaines (ce dernier est réalisé après 21 jours de traitement par la propolis). Juste avant sacrifice et à l'aide d'un capillaire, le sang a été prélevé au niveau du sinus orbital et placé dans des tubes héparinés puis centrifugé à 3000 rpm/10 min. Le sérum est conservé pour d'éventuelles utilisations. Les rats sont ensuite anesthésiés à l'éther puis euthanasiés. Les quatre lobes de la prostate, les testicules, les poumons et le foie sont prélevés, une partie est fixée au formol 10 % pour l'étude histologique et le reste est conservé à -80 °C pour l'extraction des ARN et des protéines.

II.1.5. Etude histologique

II.1.5.1. Préparation des blocs de paraffine

Après fixation des tissus dans le formol, ils ont été directement envoyés au laboratoire d'anatomopathologie du Dr. Hamel à Jijel pour la préparation des blocs de paraffine. Ces tissus ont été déshydratés en les plongeant dans des bains successifs d'alcool à degrés croissants (Shander Citadel 2000, Thermo-Scientific. Germany) puis imprégnés dans la paraffine par un distributeur automatique (Shandon Histocenter 3, Thermo-electron corporation, Germany).

II.1.5.2. Coloration Hématoxyline/Eosine

Elle a été réalisée au laboratoire GReD, Clermont Ferrand. Avant d'être colorés, les tissus sont d'abord coupés au microtome à une épaisseur de 5 µm et placés sur les lames. Le déparaffinage, la réhydratation et la coloration se font automatiquement. Après montage des lames, la lecture se fait au microscope (Zeiss) à différents grossissements.

II.1.5.3. Immunohistochimie

Le déparaffinage et la réhydratation ont été réalisés automatiquement. Le démasquage est réalisé à l'aide d'un tampon Tris-EDTA pH 9 à 95 °C pendant 40 min, suivi d'un montage des lames. Toutes les étapes suivantes de blocage, de saturation, de dépôt des anticorps primaires et secondaires ainsi que de la streptavidine-HRP ont été réalisées automatiquement à l'aide d'un robot (Intavis). Elles se font la nuit à 4 °C. Les saturations utilisées ont les concentrations suivantes : H₂O₂ 0,3 % dans du PBS 1X, saturation BSA 1 %, anticorps primaires : Ki-67 (Leica, 1/1000), AR (Santa Cruz Biotechnology, 1/1000) ; anticorps secondaires : Anti-lapin 1/500. Le lendemain, à la fin de la réaction, les lames sont placées dans du PBS 1X puis révélées avec le kit Novared. Et pour bien visualiser les noyaux, une contre coloration est réalisée en plongeant les lames dans l'hématoxyline pendant 10 secondes suivie d'un rinçage à l'eau courante.

II.1.6. Extraction des protéines

Les prostatites (ventrales et antérieures) sont coupées en petits morceaux puis mélangés avec 200 µl de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 % NP-40 ; 0,5 % acide déoxycholique ; 0,1 % SDS ; 150 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 50 mM Naf) puis broyées en présence de billes au lysat-broyer, ensuite centrifugées. La centrifugation est suivie d'une sonication de 20 secondes puis d'une deuxième centrifugation (14000 rpm/10 min). Le surnageant récupéré est conservé à -20 °C. Le dosage des protéines est effectué à l'acide bicinchoninique en utilisant une gamme étalon de BSA.

II.1.7. Analyse par *western blot*

Les protéines extraites ont été séparées par une électrophorèse SDS-PAGE sur gel de 10 % puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Les bandes à étudier sont saturées par du lait

écrémé 10 % puis mises en contact des anticorps primaires anti-AhR (Abcam, 1/100), anti-CYP1A1 (Abcam, 1/100) et anti- β -actine (Santa-Cruz Biotechnology, 1/1000) et laissées incuber toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, les membranes sont lavées et incubées en présence des anticorps secondaires (Anti-souris : 1/20000 ; Anti-lapin : 1/10000 (Abliance)) pendant une heure. Les signaux sont détectés par chimioluminescence avec analyse d'image DNR Bio Imaging Systems.

II.1.8. Extraction des ARN

L'extraction des ARN a été réalisée sur les lobes des prostatas ventrales et latérales en utilisant les différents tampons et colonnes du kit Qiagen selon les instructions du fabricant. Le dosage des ARN extraits est ensuite réalisé au Nanodrop.

II.1.9. RT-qPCR

Les ARN sont ensuite transformés en ADN par une transcription inverse en présence d'un mélange de dNTP, des random primers, de l'enzyme reverse transcriptase (MLV-RT), du tampon (RT5X M-MLV), RNAsin (Promega). Après transcription inverse, les échantillons obtenus sont dilués et une gamme allant de 1/5^e à 1/160^e est préparée pour la qPCR.

Pour la qPCR, un mélange contenant 7,5 μ l de Takara, 0,1 μ l de chacun des amorces et 4,8 μ l H₂O est préparé pour chaque échantillon dans chaque puits de la plaque qPCR à 96 puits. 2,5 μ l d'ADNc est ensuite ajouté dans chaque puits. La réaction d'amplification se déroule dans un amplificateur de type eppendorf.

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes (Su et al., 2004) :

AR : **Fw:** 5' ATTGCCCATCTTGTCGTCTCC 3'

Rv: 5' ATCTTCTGGGATGGGTCCTCA 3'

AhR : **Fw:** 5' GGGCCAAGAGCTTCTTTGATG 3'

Rv: 5' GCAAATCCTGCCAGCTCTGA 3'

CYP1A1 : **Fw:** 5' CCTGGAGACCTTCCGACATTC 3'

Rv: 5' GGGATATAGAAGCCATTCAGACTTG 3'

GADPH : Fw: 5' CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA 3'

Rv : 5' GGCATGGACTGTGGTCATGA 3'

Ce dernier a été utilisé comme gène de ménage.

II.1.10. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test-*t* de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

II.2. Résultats

II.2.1. Modifications histologiques du tissu prostatique induites par l'administration du B(a)P

Le traitement des rats Wistar avec du B(a)P par voie intra-péritonéale à une dose de 200 mg/kg a induit des modifications histologiques au niveau de la prostate. Pour suivre ces modifications, nous avons réalisé des sacrifices réguliers et réalisé aussi une étude histologique et une coloration H/E pour regarder les principaux changements. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 21.

Le début de l'apparition des lésions préneoplasiques se trouve au niveau des prostates latérales et dorsales. Au cours des deux premiers mois, aucune lésion préneoplasique n'a été remarquée. Des lésions de néoplasie intraépithéliale (PIN) commencent à s'installer au 4^{ème} mois suivant le traitement par le B(a)P. Au 6^{ème} mois après traitement, la néoplasie intraépithéliale de haut grade est présente dans toutes les prostates étudiées. Au 7^{ème} mois suivant le traitement, différents foyers de carcinomes *in situ* et invasifs sont présents dans les prostates de 15 rats parmi 16 rats sacrifiés.

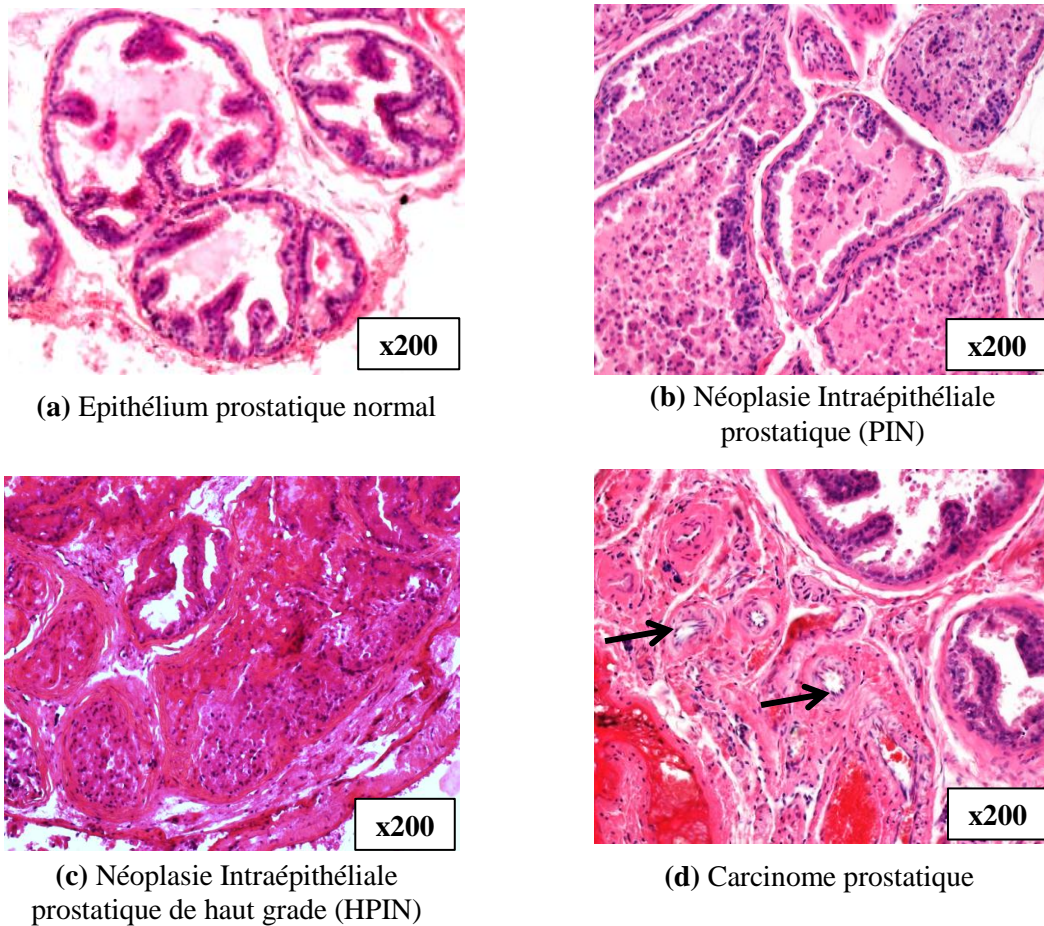


Fig.21 Modifications histologiques au cours du développement de l'adénocarcinome prostatique induit par le B(a)P. Coloration H/E de la prostate dorsolatérale x 200. (a) Epithélium normal sain, (b) PIN, (c) HPIN, (d) Carcinome prostatique.

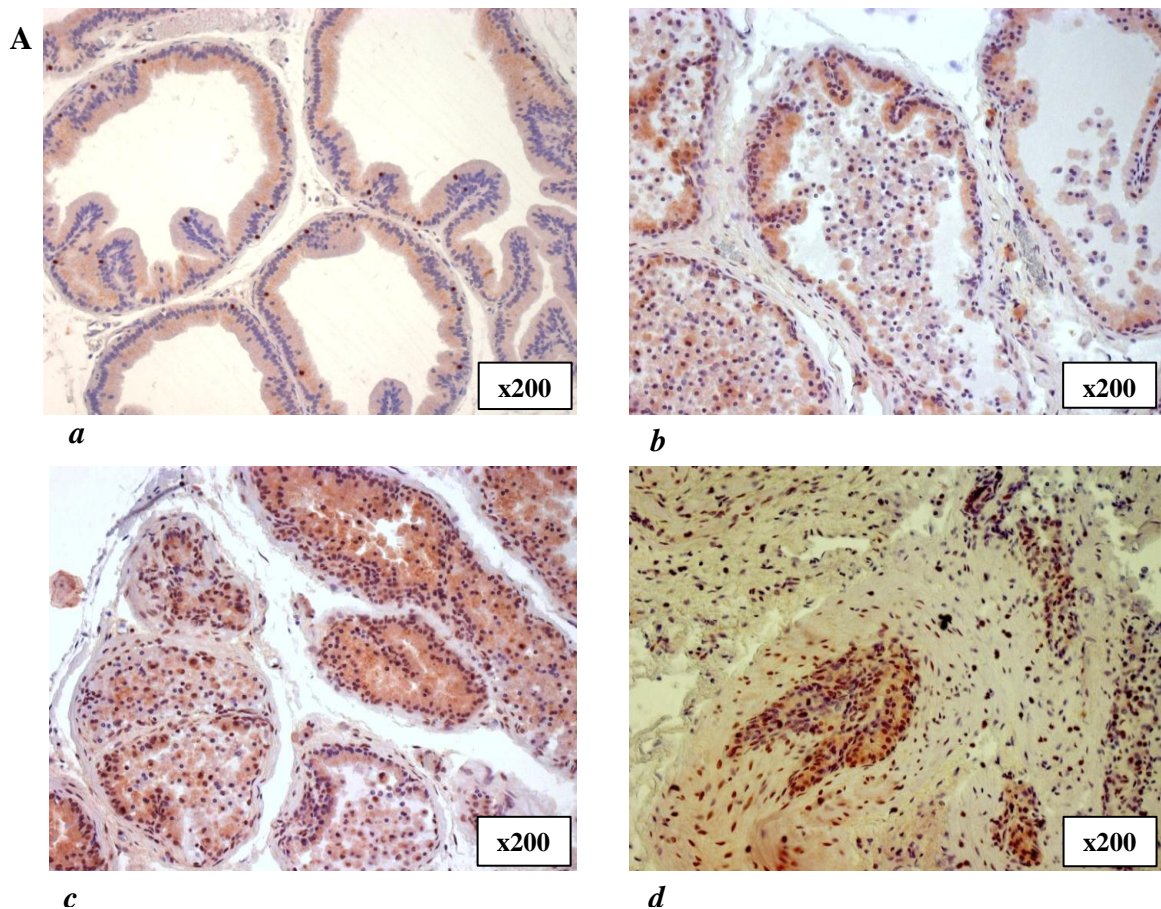
La PIN (fig. 21 b) est caractérisée par la présence de multicouches de cellules épithéliales dysplasiques avec une perte de polarité cellulaire avec une focalisation et une prolifération.

La différence entre PIN et HPIN est le degré d'atypie cellulaire dans l'épithélium. Les lésions PIN consistent en des zones focales de l'épithélium hyperplasique présentant des variations distinctes de la taille et de la forme. Les lésions préneoplasiques HPIN ont une atypie plus évidente, un élargissement nucléaire et une augmentation du degré d'encombrement nucléaire (fig. 21 c). En plus de ces caractéristiques, le carcinome est caractérisé par une croissance invasive et par la perte de la lame basale (fig. 21 d).

II.2.2. Effet du B(a)P sur la prolifération cellulaire (Indice de prolifération Ki-67)

Le Ki-67 est un marqueur de prolifération cellulaire. C'est un antigène exprimé dans les cellules prolifératives tout au long des phases G1, S, G2 et M et fournit un indice fiable de prolifération cellulaire (Zhong et al., 2008). L'indice de prolifération est déterminé par le comptage du nombre de Ki-67 positifs dans les cellules épithéliales dans 10 champs microscopiques (Lacorte et al., 2011). Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules Ki-67 positives (Nombre des noyaux marqués*100/Nombre total des cellules). Les résultats de l'étude immunohistochimique des tissus prostatiques par l'anti Ki-67 sont représentés dans la figure 22.

Nous avons évalué la distribution du Ki-67 par immunohistochimie dans la prostate dorsolatérale à différents stades de la carcinogenèse prostatique induite par le B(a)P. Le Ki-67 est surexprimé au cours du développement du cancer de la prostate. Son expression est hautement significative dans la PIN ($p < 0,001$), ce qui reflète une prolifération cellulaire très importante et très rapide. La prolifération augmente d'une manière très significative dans la HPIN et le carcinome prostatique ($p < 0,01$).



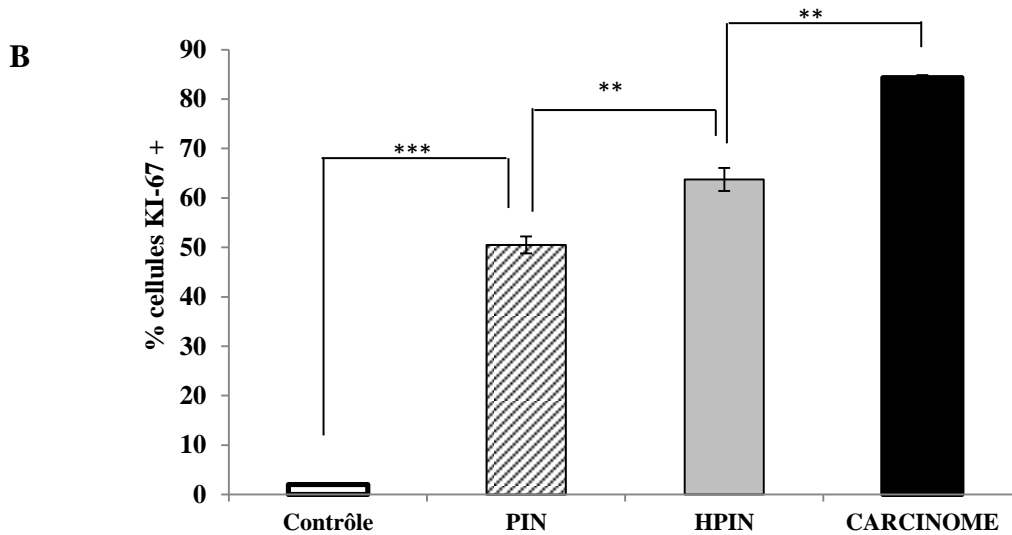


Fig.22 Expression du Ki-67 dans le tissu prostatique. Surexpression du Ki-67 dans le carcinome prostatique (d), la HPIN (c) et la PIN (b) par rapport au tissu prostatique épithélial normal (a). Coloration à l'hématoxyline x 200 au microscope optique. La couleur marron indique une coloration positive pour le Ki-67 (A). Distribution des cellules Ki-67+ dans les différents tissus prostatiques : contrôle (tissu normal) $n=10$, PIN $n=7$, HPIN $n=7$ et carcinome $n=15$ (B). Test- t de Student ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

II.2.3. Augmentation de l'accumulation de AR dans la prostate au cours de la carcinogénèse induite par le B(a)P

Comme AR est associé au développement du cancer de la prostate, nous avons étudié son expression au niveau du tissu prostatique. Une augmentation significative de son expression ($p<0,05$) a été observée au niveau des transcrits ARNm du tissu cancéreux induit par le B(a)P par rapport aux prostates saines traitées par le véhicule, étudiés par RT-qPCR (fig. 23B). L'accumulation protéique a été étudiée par immunohistochimie. La figure 23A montre une forte présence (mais non quantifiable par cette méthode) de AR au niveau nucléaire dans le tissu prostatique cancéreux induit par le B(a)P (b) par rapport au tissu prostatique sain traité par le véhicule (a).

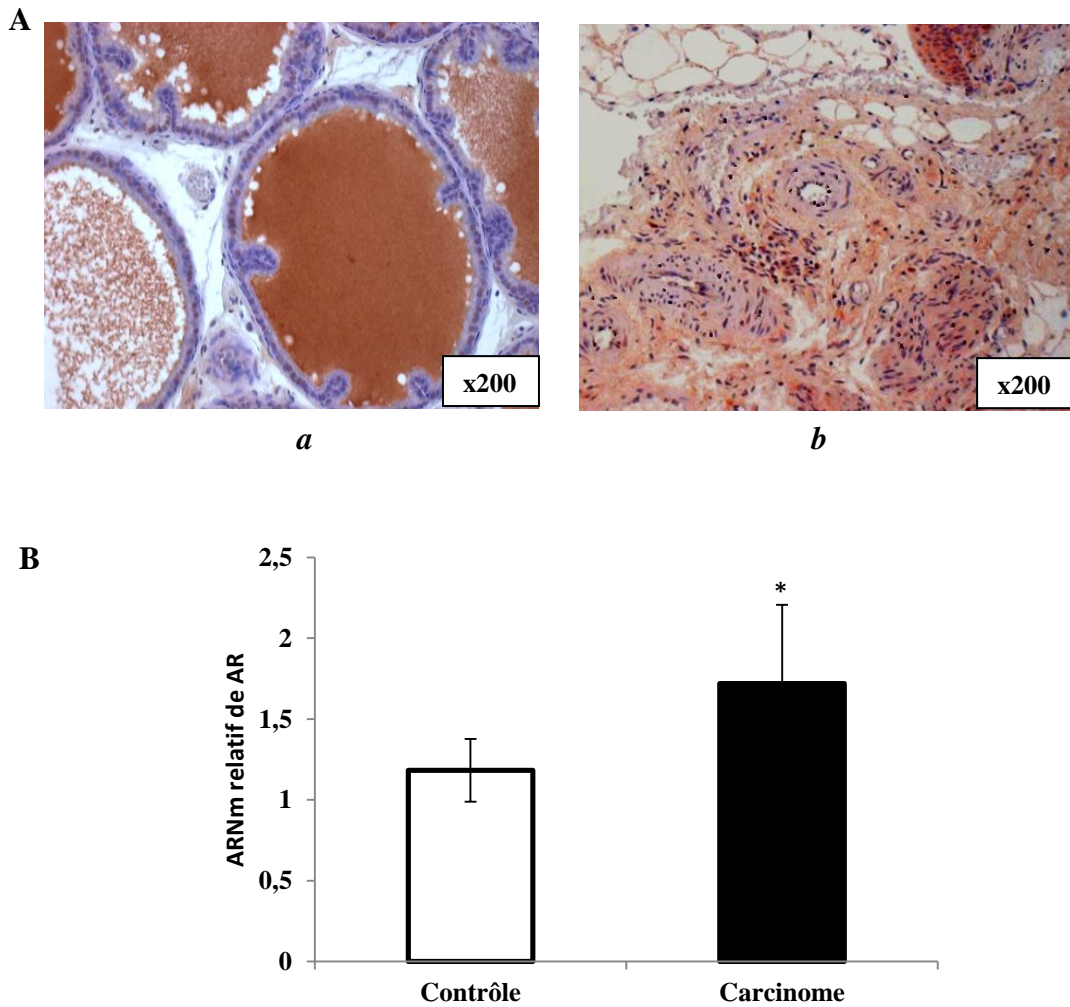


Fig.23 Expression de AR dans le tissu prostatique. Suraccumulation de AR dans le carcinome prostatique (b), par rapport au tissu prostatique épithélial normal (a). Coloration à l'hématoxyline x 200 au microscope optique. La couleur marron indique une coloration positive pour AR (A). Expression de AR au niveau des ARNm dans les tissus prostatiques : Contrôle (tissu normal traité par le véhicule $n=10$) et carcinome induit par le B(a)P $n=15$ (B). Test- t de Student $*p<0,05$.

II.2.4. Augmentation de l'expression de AhR dans la prostate au cours de la carcinogenèse induite par le B(a)P

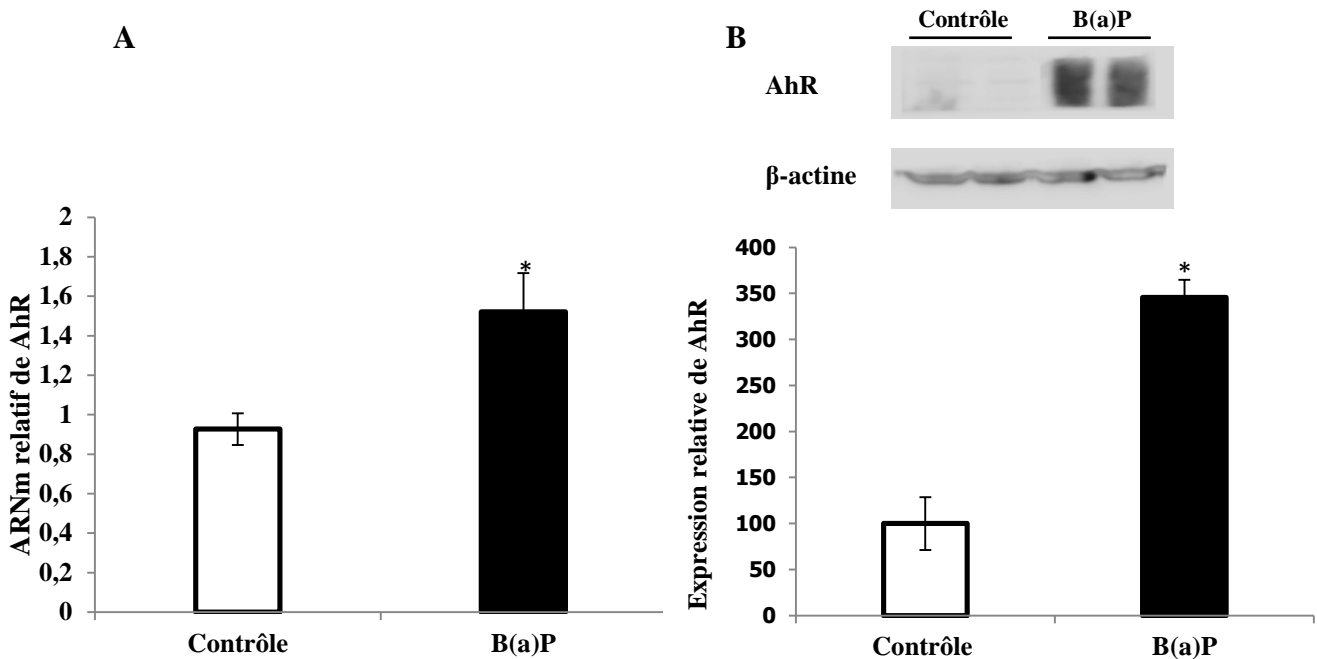


Fig.24 Expression relative des niveaux des ARNm de AhR dans le tissu prostatique mesurée par RT-qPCR (A). Représentation des niveaux protéiques relatifs de AhR dans le tissu prostatique mesurés par *Western blot* (B). Contrôle (prostate saine traitée par le véhicule $n=10$), B(a)P (Carcinome induit par le B(a)P $n=15$). Test-*t* de Student * $p<0,05$.

L'étude de l'accumulation de AhR par *western blot* a montré qu'il est fortement présent dans les tissus prostatiques cancéreux induits par le B(a)P par comparaison aux prostates des rats contrôles sains traités par le véhicule (Fig. 24B). Nous avons aussi enregistré une augmentation hautement significative de l'expression des transcrits de AhR au niveau du tissu cancéreux induit par le B(a)P par comparaison aux tissus contrôles sains traités par le véhicule (Huile d'olive) (Fig. 24A).

II.2.5. Induction du cytochrome CYP1A1

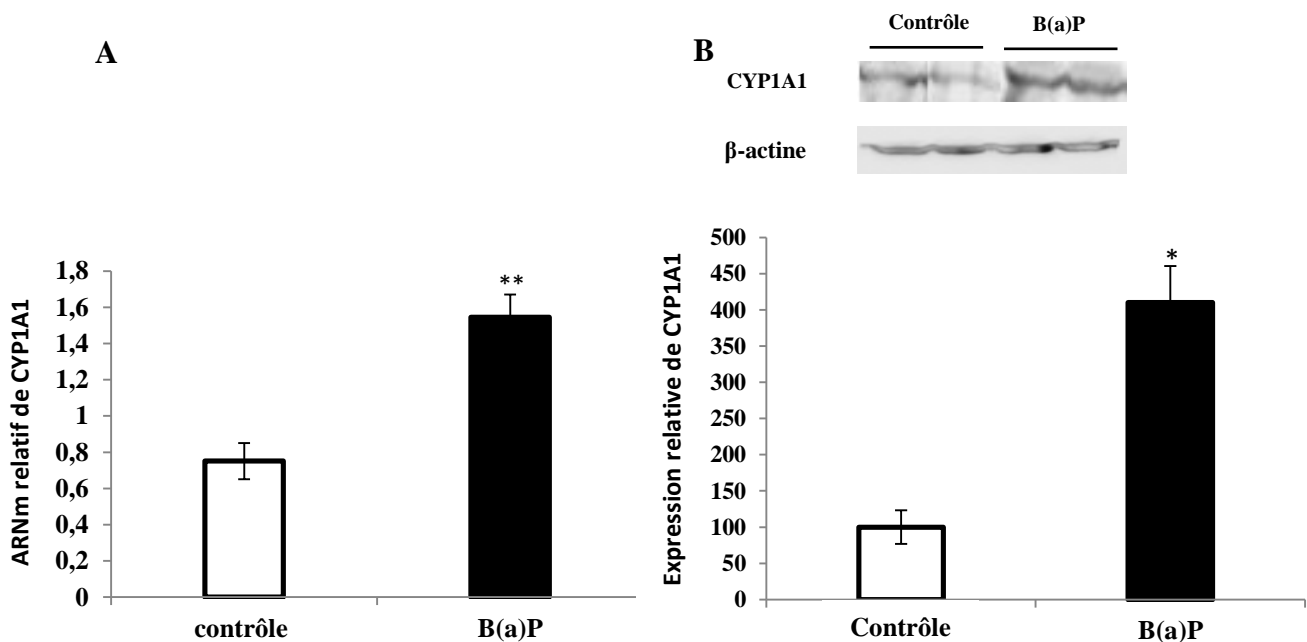


Fig.25 Expression relative des niveaux des ARNm de CYP1A1 dans le tissu prostatique mesurée par RT-qPCR (A). Représentation des niveaux protéiques relatifs de CYP1A1 dans le tissu prostatique mesurés par *Western blot* (B). Contrôle (prostate saine traitée par le véhicule $n=10$), B(a)P (Carcinome induit par le B(a)P $n=15$). Test-*t* de Student * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

La figure 25 montre que le cancer prostatique induit par le B(a)P est caractérisé par une augmentation très significative ($p<0,01$) de l'expression du cytochrome 1A1 au niveau des ARNm mesurée par RT-qPCR et une augmentation significative ($p<0,05$) de son expression au niveau protéique. Ce cytochrome est impliqué dans le métabolisme du B(a)P dans ses tissus cibles.

II.2.6. La propolis diminue la croissance des cellules cancéreuses prostatiques

Notre but était de vérifier si l'extrait de propolis exerce un effet sur la prolifération des cellules prostatiques *in vivo*. Nous avons administré l'extrait de propolis (20 mg/kg, 1 ml) aux rats Wistar développant un carcinome prostatique induit par le B(a)P puis étudié l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 dans ces tissus. Les rats ont obtenu une dose journalière de l'extrait de propolis *per os* pendant 21 jours puis décapités et les prostates ont été obtenues et conservées pour l'étude histologique.

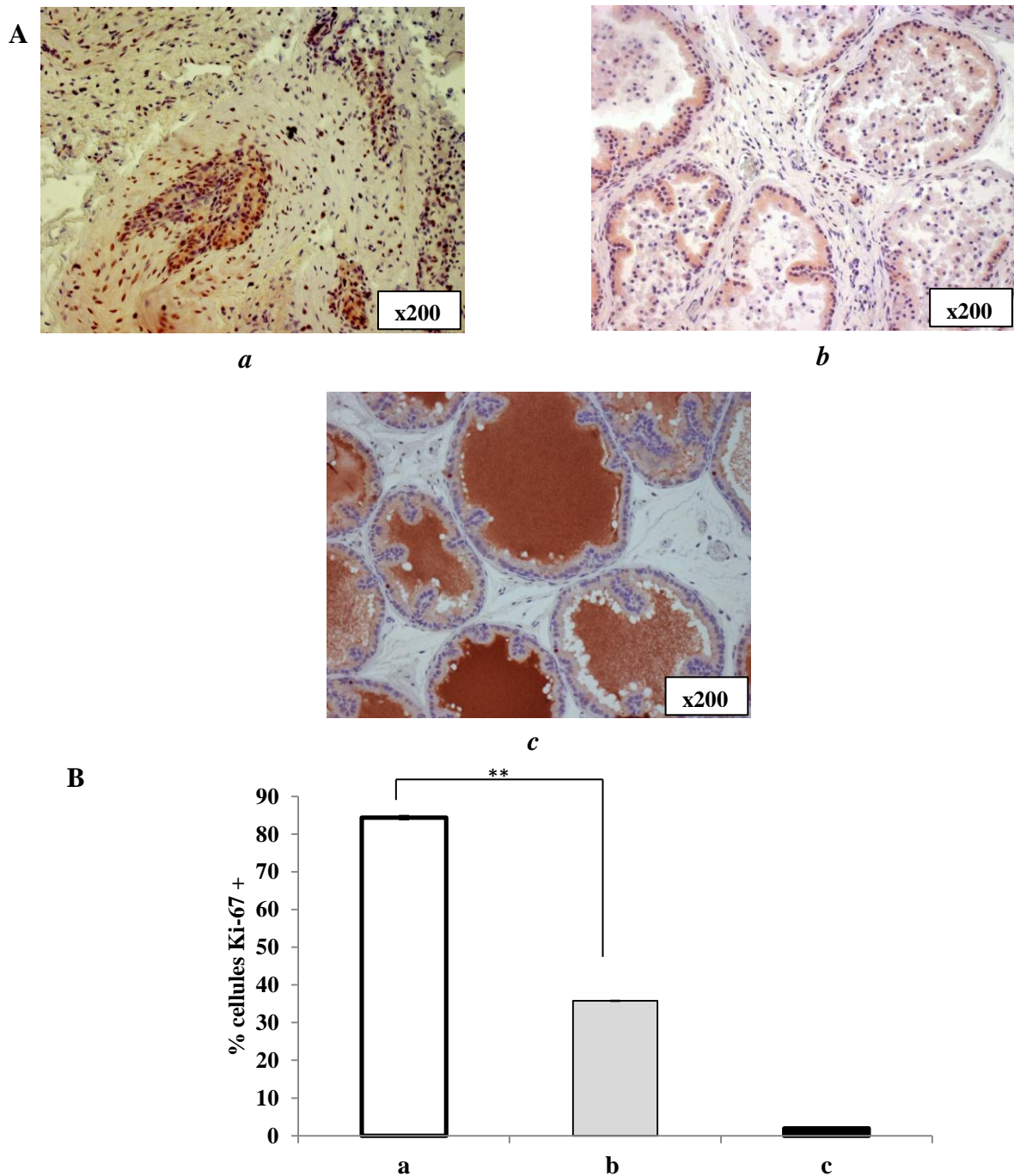
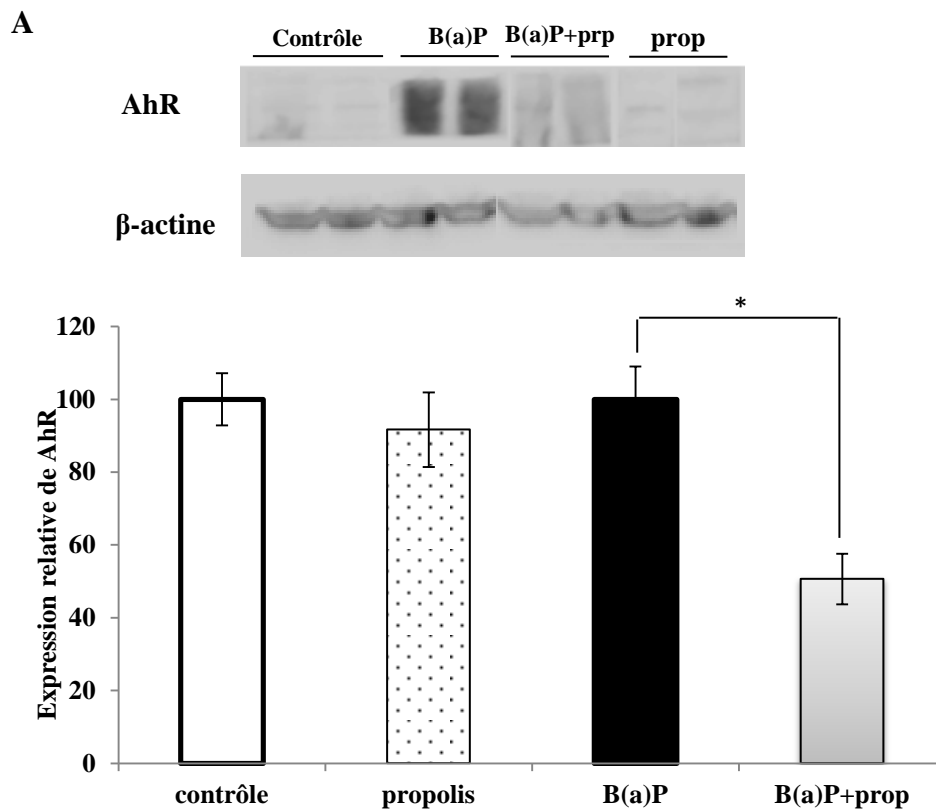


Fig.26 Expression du Ki-67 dans le tissu prostatique. Diminution de l'expression du Ki-67 après traitement par la propolis (b) par rapport au tissu prostatique cancéreux non traité (a). (c) représente un contrôle positif des tissus prostatiques sains traités par la propolis seule. Coloration à l'hématoxyline x 200 au microscope optique. La couleur marron indique une coloration positive pour le Ki-67 (A). Distribution des cellules Ki-67+ dans les différents tissus prostatiques : (a) carcinome non traité ($n=15$), (b) carcinome traité par la propolis ($n=10$) et (c) tissu sain traité par la propolis seule ($n=10$) (B). Test- t de Student $**p<0,01$.

L'étude immunohistochimique a montré que l'extrait de propolis possède un effet antiprolifératif (Fig. 26). Il entraîne une réduction de 49 % des cellules Ki-67 positives et donc de la prolifération. Par contre, le traitement des rats sains par la propolis n'affecte pas la prolifération cellulaire des cellules prostatiques.

II.2.7. La propolis module l'expression de AhR

Nous avons étudié l'expression de AhR dans le tissu prostatique après traitement par la propolis au niveau des transcrits ARNm étudiés par RT-qPCR et au niveau protéique étudiés par *Western blot*. Les résultats sont présentés dans la figure 27.



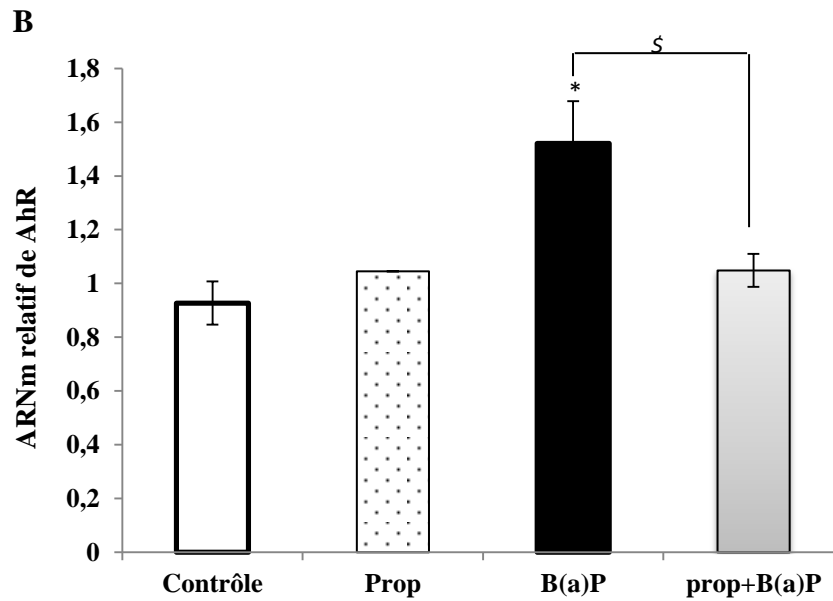


Fig.27 Expression de AhR dans le tissu prostatique, au niveau protéique (A) et des ARNm (B). Contrôle (prostate saine $n=10$) ; prop (Rats sains traités par la propolis $n=10$), B(a)P (Rats traités par le B(a)P (cancer de la prostate) $n=15$) et prop+B(a)P (Rats avec cancer de la prostate traités par propolis $n=10$). * $p<0.05$, \$ $p<0.05$.

AhR est surexprimé dans le carcinome prostatique induit par le B(a)P. l'administration de la propolis (20 mg/kg) à ces rats entraîne une diminution significative ($p<0,05$) de son expression au niveau des ARNm (fig. 27B) et au niveau protéique (Fig. 27A). Par contre, la propolis administrée seule à des rats Wistar sains n'entraîne par des modifications significatives de son expression comparativement aux rats sains traités par le véhicule (contrôles) ($p>0,05$).

II.3. Discussion

Les modèles animaux particulièrement les modèles de rats et de souris jouent un rôle central dans l'étude de l'étiologie, de la prévention et du traitement du cancer de la prostate humain. Les modèles de cellules en culture sont extrêmement utiles pour la compréhension de la biologie du cancer de la prostate mais ils ne reflètent pas la complexité des interactions cellulaire avec le microenvironnement tumoral qui jouent un rôle clé dans l'initiation et la progression du cancer (Ittman et al., 2013). Dans la majorité des cas, le traitement par les cancérigènes chimiques spécifiques pour induire les tumeurs est une stratégie essentielle pour la découverte et l'identification des modifications génétiques. Par exemple, l'application

topique du cancérogène DMBA a été utilisée pour développer la souche de souris SENCAR très susceptible. Le traitement des souris A/J avec de l'uréthane ou N-éthyl-N-nitrosurée (ENU), a été utilisé pour identifier les locus de susceptibilité au cancer du poumon (Kemp, 2015). Dans les années 1930, il a été montré que les composés chimiques purs comme le B(a)P, le dibenz(a,h)anthracène et le 3-méthylcholanthrène appartenant à la famille des HAP induisent l'apparition des tumeurs chez les souris (Kemp, 2015).

Nous avons montré par l'étude histologique par coloration H/E et à travers l'étude de la prolifération par immunohistochimie du Ki-67 que le B(a)P administré chez le rat Wistar par voie intrapéritonéale entraîne le développement du cancer de la prostate. Après 7 mois de traitement avec le B(a)P, nous avons obtenu un modèle de développement de la carcinogenèse prostatique passant par l'apparition de néoplasie intraépithéliale prostatique puis de néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade puis de carcinome. Mais nous n'avons pas attendu jusqu'au développement de cancer métastatique pour des problèmes éthiques liés aux animaux qui étaient réservés à l'étude des effets de la propolis.

Différentes études ont montré que le Ki-67 est un indicateur pronostique aux différents stades du cancer de la prostate. C'est un marqueur intéressant du cancer de la prostate aux stades précoces. Ils est utilisé sur les biopsies, sur les pièces opératoires après prostatectomie et après radiothérapie (Berney et al., 2009).

Les modèles animaux de la carcinogenèse contribuent largement à la compréhension de la carcinogenèse humaine. L'utilisation de ces modèles permet l'identification des agents carcinogènes et leur étude sous des conditions contrôlées ainsi que leur mécanisme d'action (Bosland et al., 1990).

Le benzo(a)pyrène, en lui-même est un procarcinogène. Cependant, il agit comme un carcinogène chez les animaux lorsqu'il est activé après son métabolisme et provoque des mutations des gènes en se liant à l'ADN. Ceci est appelé initiation de la carcinogenèse provoquée par le B(a)P. La phase caractérisée par la croissance des cellules irréversiblement transformées est appelée promotion tumorale (Kasala et al., 2015).

Dans notre modèle nous avons étudié l'expression du récepteur AhR. Nous avons montré qu'il est fortement exprimé dans le cancer de la prostate induit par le B(a)P au niveau des ARNm et des protéines. AhR est le médiateur de l'effet toxique de plusieurs molécules comme le B(a)P appartenant à la famille de HAP. C'est un facteur de transcription activé par

la liaison à son ligand (Safe et al., 2013) et qui active l'expression de plusieurs gènes cibles comme CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B2.

Gluschnaider et al. (Gluschnaider et al., 2010), ont montré la présence d'une forte expression de AhR au niveau protéique dans les tumeurs prostatiques humaines aux niveaux cytosoliques et nucléaires. Ceci a été aussi montré dans d'autres types de cancers tels que le cancer du pancréas, du tractus urinaire, du poumon et de l'œsophage (Safe et al., 2013).

L'utilisation de cellules humaines d'hépatocarcinome HepG2 invalidées pour AhR ou l'utilisation de l'ARN interférence entraîne une inhibition de la croissance et une diminution de la régulation de plusieurs gènes du cycle cellulaire comme la cycline D1 et E, cdk2 et cdk4 (Abdelrahim et al., 2003). Tran et al. (Tran et al., 2013) ont montré que dans les cellules C4-2 androgéno-indépendantes du cancer de la prostate, l'inactivation de AhR (KO AhR) entraîne une diminution de la croissance cellulaire.

L'étude des cellules et tissus des adénocarcinomes pulmonaires montrait que les niveaux de AhR en ARNm et protéines sont hautement exprimés par rapport au tissu pulmonaire normal et aux cellules épithéliales bronchiques (Lin et al., 2003). Les auteurs suggéraient aussi que l'expression de AhR est corrélée à l'invasivité de la tumeur. En plus de l'effet promoteur du récepteur AhR, ce dernier joue aussi un rôle médiateur dans la formation des adduits à l'ADN. Ceci a été démontré dans les poumons de souris AhR+ (Nerurkar et al., 1996). Revel et al. (Revel et al., 2003) suggèrent que l'activation de AhR et l'induction du CYP1A1 est nécessaire pour la formation des adduits d'ADN induits par le B(a)P.

Dans notre étude nous avons aussi enregistré une forte expression de CYP1A1 dans le tissu cancéreux prostatique induit par le B(a)P au niveau protéique étudié par western blot et aussi au niveau des transcrits CYP1A1.

Il est connu que le potentiel carcinogène du CYP1A1 est associé à l'activation métabolique de certains carcinogènes comme les HAP, ce qui conduit à la formation d'adduits. Les HAP produisent des niveaux significatifs d'adduits dans les cellules cancéreuses prostatiques (Mitsui et al., 2016). Des méta-analyses ont aussi montré une association entre les polymorphismes du CYP1A1 et le risque du cancer de la prostate (Mitsui et al., 2016), ce qui suggère la contribution du CYP1A1 dans la tumorigenèse prostatique.

L'un des mécanismes pourrait être l'hypométhylation du promoteur de CYP1A1. Ceci a été étudié dans le tissu pulmonaire humain (Anttila et al., 2003 ; Tekpli et al., 2012). Cette

altération du gène CYP1A1 contribue à la carcinogenèse pulmonaire induite par la cigarette (Anttila et al., 2003 ; Tekpli et al., 2012). Plusieurs études ont montré l'existence d'une association entre la cigarette et l'augmentation du risque de cancer de la prostate (Rohrman et al., 2013 ; Rieken et al., 2015 ; Zapata et al., 2015). Mitsui et al. (Mitsui et al., 2016) ont montré une augmentation de l'expression de CYP1A1 dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate (PC-3, LNCaP et du DU145) par comparaison à l'HBP. Ceci est dû à la méthylation du promoteur du CYP1A1. Les mêmes auteurs ont montré que chez les fumeurs, le site XRE-1383 est celui touché par rapport aux non-fumeurs ($p < 0,05$). Par l'hypométhylation de son promoteur, le CYP1A1 joue donc rôle oncogène dans le cancer de la prostate induit par le tabagisme. Une expression constitutive de CYP1A1 et du CYP1A2 dans les cellules du cancer de la prostate DU145, PC-3 et LNCaP a été aussi observée (Sterling et Cutroneo, 2004).

La thérapie conventionnelle contre le cancer de la prostate visant à inhiber la prolifération et à prévenir le développement des métastases est basée sur l'utilisation de la chimiothérapie et de l'hormonothérapie. Malheureusement, ces médicaments restent toujours limités à cause de leurs effets indésirables, à la résistance des tumeurs et à leurs prix très coûteux. Pour cela, la recherche de nouveaux agents devient une nécessité.

Les produits naturels sont de plus en plus étudiés pour leurs effets antiprolifératifs. La propolis fabriquée par les abeilles est très riche en composés bioactifs comme les flavonoïdes, les acides phénoliques et les terpènes. La propolis possède diverses activités thérapeutiques antibactérienne, antiparasitaire, anti-inflammatoire, antioxydante et antiproliférative testée sur divers types de lignées cellulaires (Zabaiou et al., 2017).

Dans notre étude, nous avons utilisé la propolis jijelienne. L'administration orale de la propolis aux rats Wistar développant un adénocarcinome induit par le B(a)P a entraîné une diminution de la prolifération cellulaire et une réduction de 49 % de l'expression du Ki-67. Cela a été démontré par l'étude histologique (coloration H/E) et par le test de prolifération Ki-67. Étudiée déjà sur des souris atteintes de tumeurs B16F1 du mélanome, cette propolis augmente la survie des souris de 30 %, une réduction de l'index mitotique (-75 %) et du Ki-67 (-50 %) (Benguedouar et al., 2016).

Beaucoup d'études ont déjà étudié l'effet de la propolis sur le développement du cancer de la prostate. Ceci a été bien documenté dans l'étude bibliographique. Ces études montraient que la propolis agit sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques des différentes

lignées étudiée généralement par le test MTT, mais les mécanismes moléculaires impliqués sont très peu décrits. Nous avons montré que notre propolis agit sur l'expression du récepteur nucléaire AhR aux niveaux transcriptionnels et protéiques.

AhR est un facteur de transcription activé par des ligands spécifiques et qui joue le rôle de médiateur de l'action de diverses molécules toxiques mais aussi des effets biologiques des ligands naturels. Il a été montré que la consommation d'aliments riches en ligands de AhR conduit au déclenchement de la cascade d'activation de AhR. La transduction du signal des ligands naturels du AhR diffère de celle des molécules toxiques comme la dioxine (Amakura et al., 2010).

Park et al. (Park et al., 2003) ont montré que l'extrait éthanolique de la propolis brésilienne contenant de fortes concentrations en flavonoïdes, supprime la transformation de AhR induite par son ligand toxique TCDD d'une manière dose-dépendante. Cette propolis possède un puissant effet antagoniste de AhR.

Quelques flavones comme l'apigénine et flavonols comme la quercétine présents dans la propolis possèdent un effet antagoniste inhibiteur de AhR activé *in vitro* par la dioxine TCDD, un agoniste synthétique toxique de AhR (Amakura et al., 2008).

La techochryisine, un autre flavonoïde de la propolis, possède par contre un effet agoniste activateur de AhR (Amakura et al., 2010).

II.4. Conclusion

Nous avons pu développer chez le rat Wistar un modèle chimique de carcinogenèse prostatique induite par le benzo(a)pyrène. Ce modèle peut être utilisé pour tester l'effet antiprolifératif ou anticancéreux en mode préventif ou curatif de divers extraits ou molécules.

L'extrait de propolis administré à ces rats entraîne une diminution de la prolifération cellulaire déterminée par l'expression du Ki-67 et d'une diminution de l'expression du récepteur AhR au niveau des transcrits ARNm et au niveau protéique.

Pour mieux comprendre l'effet de l'extrait de propolis sur le cancer de la prostate, nous avons réalisé une autre étude *in vitro* sur les cellules LNCaP hormono-dépendantes du cancer de la prostate (Projet 3).

III. La propolis possède une activité antagoniste de AR et affecte la survie d'une lignée de cellules de cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer le plus répandu chez l'homme et la deuxième cause de décès par cancer après celui du poumon. C'est une maladie très hétérogène en termes de pathologie et de présentation clinique. Ce cancer, localisé à son début, peut être efficacement traité par prostatectomie ou par radiothérapie. Pour les cancers les plus avancés, la déprivation androgénique visant à bloquer la signalisation du récepteur des androgènes (AR) est un traitement initial efficace. Malheureusement, après peu de temps, ce cancer devient résistant à la castration. Cette résistance peut être associée à une augmentation de la quantité de AR. Il est donc indispensable de développer de nouvelles molécules, d'origine naturelle pour en réduire les coûts et permettre une accessibilité plus importante pour un plus grand nombre, plus actives et n'induisant pas d'augmentation de la quantité de AR. En effet, les produits naturels constituent une source riche et prometteuse pour la découverte de nouveaux agents pharmaceutiques. Plus de la moitié des médicaments actuellement existants sont des composés naturels ou dérivés (Newman et Cragg, 2007) et plus de 70 % des médicaments anticancéreux proviennent de composés naturels (Sforcin, 2011).

La propolis est un complexe naturel fabriqué par les abeilles à partir de leurs propres sécrétions et d'une série de molécules gommeuses, cireuses et balsamiques. Pour une revue générale exhaustive se reporter à Zabaïou et al. 2017. Plusieurs effets pharmaceutiques ont été attribués à la propolis. Notre propolis a été étudiée pour ses effets antibactériens, antioxydants, antiprolifératif contre le mélanome mais jamais contre le cancer de la prostate.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la propolis de Jijel sur les cellules LNCaP en culture, dérivant d'une métastase d'un cancer de la prostate et hormonosensibles.

III.1. Matériels et Méthodes

III.1.1. Culture cellulaire

Deux lignées de cancer humain ont été utilisées : les cellules LNCaP, caractérisées par un potentiel métastatique faible (Horoszewicz et al. 1983) et les cellules HeLa qui sont des cellules du cancer du col de l'utérus caractérisées par une prolifération rapide et utilisées uniquement pour les tests de transfections transitoires (Lucey et al., 2009).

Les cellules LNCaP ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 medium (Invitrogen) et les cellules HeLa dans du milieu DMEM (Invitrogen), contenant tous les deux 10 % du sérum bovin fœtal (SBF) (FCS, Biowest, Nuaille, France), 1 % pénicilline et 1 % streptomycine (Invitrogen). Les cellules ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂.

III.1.2. Préparation de l'extrait de propolis

L'extrait de propolis est identique à celui utilisé dans l'étude *in vivo* chez le rat (projet 2). C'est de la propolis collectée à partir des ruches de la Wilaya de Jijel et préparée au niveau du laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie de l'Université de Jijel (Boutabet et al., 2011). L'extrait sec de propolis a été dilué dans l'éthanol 1/1000^{ème} avant utilisation sur les cellules en culture.

III.1.3. Test de prolifération cellulaire MTT

La survie cellulaire a été estimée en utilisant le test MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich).

Les cellules LNCaP ont étéensemencées à une concentration de 10000 cellules/ puit dans une plaque de 96 puits dans 200 µl du milieu RPMI medium complet. Après 24 h, les cellules ont été traitées avec de l'éthanol 1/1000 ou la propolis à 0,005 mg/ml ; 0,01 mg/ml ; 0,05 mg/ml et 0,1 mg/ml. Après incubation pendant 24 h, 48 h et 72 h, 30 µl de MTT (5 mg/ml dans du PBS) ont été ajoutés à chaque puits et la plaque a été incubée pendant 2 h 45 min à 37 °C dans l'obscurité. Le MTT a été après enlevé et remplacé par 200 µl de mélange de révélation et la plaque a été agitée pendant 20 min. l'absorbance est par la suite mesurée à 490 nm au lecteur de plaques (Bio-Rad 11885). Le pourcentage de la survie cellulaire a été calculé comme suit :

Survie cellulaire (%) = 100-(DO test-DO blanc / DO control-DO blanc)*100.

III.1.4. Analyse par *western blot*

Les cellules LNCaP ont été incubées dans des plaques 6 puits (350000 cellules/puit ; 1,5 ml) dans du milieu RPMI medium complet pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Après incubation, les cellules ont été traitées avec de l'éthanol ou la propolis 0,04 mg/ml (= IC₅₀) et les protéines

ont été extraites après 4 h, 10 h et 24 h de traitement en utilisant le tampon de lyse (25 Mm Tris-Hcl pH 7,6 ; 50 mM Nacl ; 1 % NP-40 ; 1 % sodium deoxycholate ; 0,1 % sodium dodecyl sulfate ; IP 1x ; PMSF 100 mM ; NaVO₄ 100 mM ; NaF 0,01 mM ; DTT 1 mM) puis par sonication et centrifugation à 14000 rpm/10 min à 4 °C. La concentration des protéines a été ensuite déterminée en utilisant la méthode de Bradford. Les protéines extraites et purifiées (40 µ/puit) ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE en utilisant des gels de dodecyl sulfate polyacrylamide de 10 % et 12 % ensuite transférées sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad).

Après transfert et coloration au rouge ponceau, les membranes de nitrocellulose sont bloquées au lait écrémé 10 % dans du tampon tris + tween 20 pendant 1 h puis incubées en présence des anticorps primaires (PARP : 1/1000, AR : 1/1000, β-Actine : 1/1000, Santa Cruz Biotechnology) à 4 °C pendant 24 h. Le lendemain, les membranes sont lavées puis incubées en présence des anticorps secondaires couplés à HRP (Anti-lapin : 1/5000, Anti-souris : 1/10000, Abliance) pendant 1 h. Les signaux sont détectés par chimioluminescence avec analyse d'image DNR Bio Imaging Systems.

III.1.5. Extraction des ARN et analyse par RT-qPCR

Les cellules LNCaP ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une concentration de 350000 cellules/puit puis traitées avec de l'éthanol, de la propolis (0,04 mg/ml), de la DHT 10⁻⁸ M et de l'association propolis + DHT 10⁻⁸ M pendant 2 h, 4 h, 10 h et 24 h. les ARN ont été extraits des cellules en utilisant du trizol (Tri-Reagent MRC) ensuite la RT a été réalisée en utilisant la M-MLV reverse transcriptase (Promega) selon les instructions du fabricant. Les ADN obtenus ont été utilisés pour étudier l'expression de 2 gènes cibles du récepteur des androgènes qui sont SGK1 et FKBP5. L'actine a été utilisée pour la normalisation par qPCR de type Eppendorf.

Les amorces utilisées en qPCR sont les suivants (de 5' vers 3') : hSGK1: Fw : CTGTGAATTCCCCACGGTGGAAAATG, Rv : CAGGCTGGGACTCTGATGCTTGTC ; hFKBP5 : Fw : AATGGTGAGGAAACGCCGATG, Rv : TCGAGGGAATTTTAGGGAGACT ; β-actine: Fw : CGCGAGAAGATGACCCAGATC, Rv : TCACCGGAGTCCATCACGA.

III.1.6. Cyométrie en flux

Les cellules LNCaP ont étéensemencées dans des plaques 6 puits dans un volume de 1,5 ml du milieu RPMI 1640 medium + 10% SBF. Après 24 h, l'induction des cellules a été faite en utilisant de la propolis (0,04 mg/ml) et de l'éthanol comme contrôle. Après incubation pendant 24 h, les cellules sont trypsinisées, comptées puis collectées dans 200 µl RNase A (200 µg/ml). 200 µl IP (50 µg/ml) sont ensuite ajoutés au mélange. Après incubation 5 min à 4 °C, le cycle cellulaire a été étudié par la cytométrie en flux (Thermo Fisher).

III.1.7. Test du gène rapporteur de la luciférase

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques 12 puits contenant du DMEM avec du SBF 10 %. Après 24 h, les cellules ont été incubées en présence du plasmide rapporteur de la luciférase qui contient un élément de réponse aux androgènes ARE-tk luc et du récepteur des androgènes AR et transfectées en utilisant le jetprime (Polyplus-Transfection, France) comme transfectant selon les recommandations du fabricant. Après 6 h, les cellules ont été stimulées (induction) par un traitement avec de la propolis (0,5 mg/ml - 0,1 mg/ml - 0,05 mg/ml - 0,01 mg/ml - 0,005 mg/ml) et/ou la DHT (10^{-8} M) et R1881 (un androgène de synthèse 10^{-7} M) puis incubées pendant 24 h. L'activité de la luciférase a été mesurée en utilisant un lecteur de l'activité luciférase et la concentration des protéines par la méthode de Bradford.

III.1.8. Etude statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test-*t* de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

III.2. Résultats

III.2.1. L'extrait de propolis diminue la prolifération cellulaire des cellules LNCaP

L'effet de l'extrait de propolis sur la survie des cellules LNCaP a été mesuré par le test MTT en présence de l'éthanol comme témoin négatif et d'extrait de propolis à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h de traitement. La métabolisation du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium en formazan a été évaluée par spectrophotométrie. Les résultats présentés dans la figure 28 montrent que l'extrait de la propolis induit une diminution de la survie cellulaire des cellules LNCaP d'une manière dose dépendante comparativement à l'éthanol. L'extrait de la propolis induit la mort cellulaire des cellules LNCaP à une $IC_{50} = 0,04$ mg/ml.

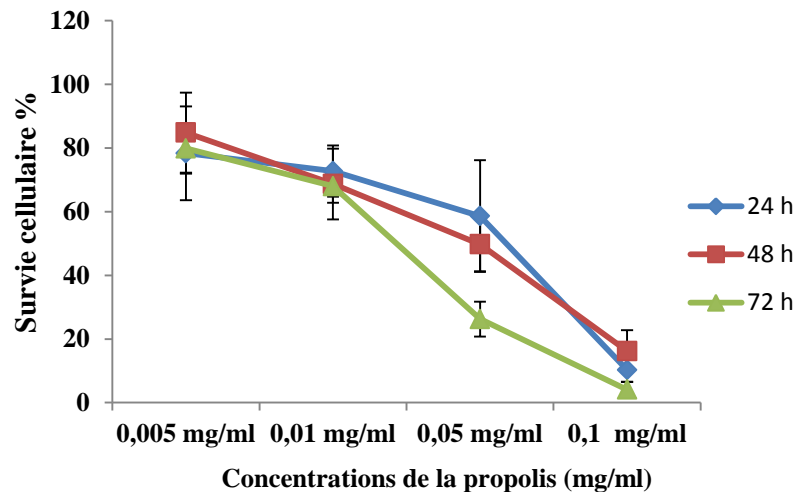


Fig.28 Effet de l'extrait de propolis sur la survie cellulaire des cellules LNCaP. La mesure a été déterminée par le test MTT et la concentration inhibitrice 50 % (IC_{50}) de la propolis sur les cellules LNCaP a été déterminée. $N=4$ en octuplât.

III.2.2. La propolis induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules LNCaP

L'analyse par *western blot* des deux formes PARP et PARPc dans les cellules LNCaP traitées par la propolis à 0,04 mg/ml et l'éthanol montre que la propolis induit une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'accumulation de PARPc après 10 h de traitement.

L'étude de l'effet de la propolis sur la distribution du cycle cellulaire par la cytométrie de flux des cellules LNCaP a révélé que après 24 h de traitement, cet extrait de propolis induit l'arrêt

des phases G0/G1 et une diminution très significative ($p < 0,01$) du nombre de cellules en phase S.

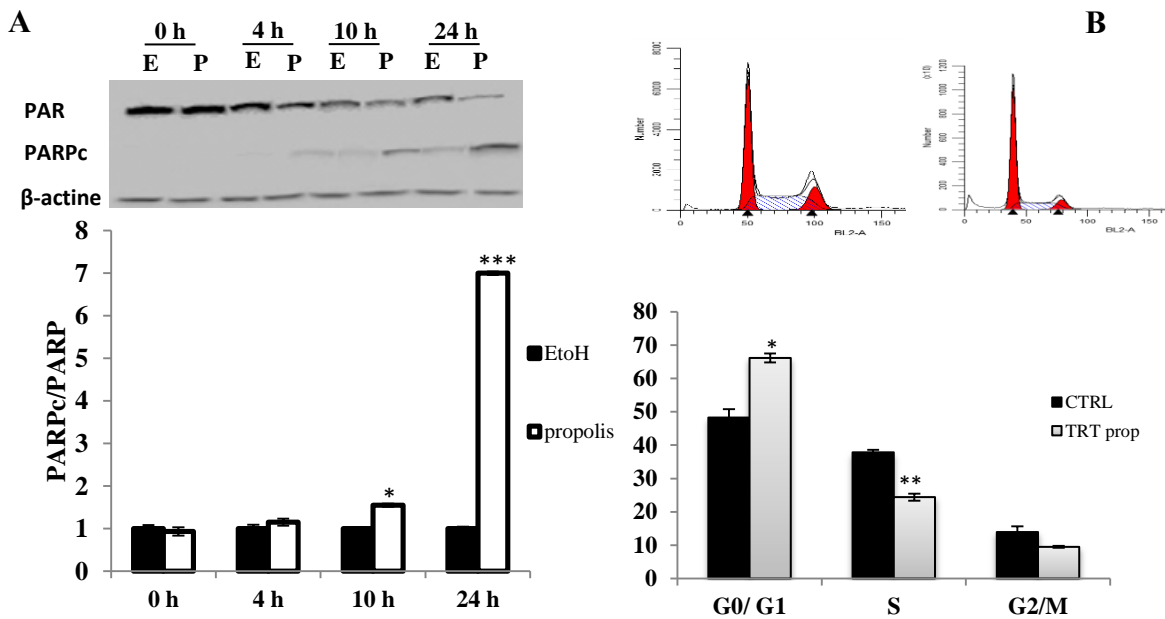


Fig.29 L'extrait de propolis à 0,04 mg/ml (IC50) induit l'apoptose par l'augmentation des niveaux de cPARP (A) et régule le cycle cellulaire des cellules LNCaP (B). E=éthanol, P= propolis, CTRL= Ethanol. N=3. Test-*t* de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

III.2.3. La propolis diminue l'accumulation de AR et de son gène cible PSA

L'accumulation protéique de AR a été mesurée par *western blot*. Les cellules LNCaP ont été traitées par l'éthanol et/ou la propolis (0,04 mg/ml). L'analyse a été effectuée après 4 h, 10 h et 24 h de traitement. Les résultats montrent que l'extrait de propolis induit une diminution significative ($p < 0,05$) de l'accumulation de AR après seulement 4 h de traitement (Figure 30A). La sécrétion de PSA est sous le contrôle de AR. Les résultats de la figure 30B montrent que la propolis (0,04 mg/ml) induit une diminution significative ($p < 0,05$) des niveaux de PSA après 2 h de traitement.

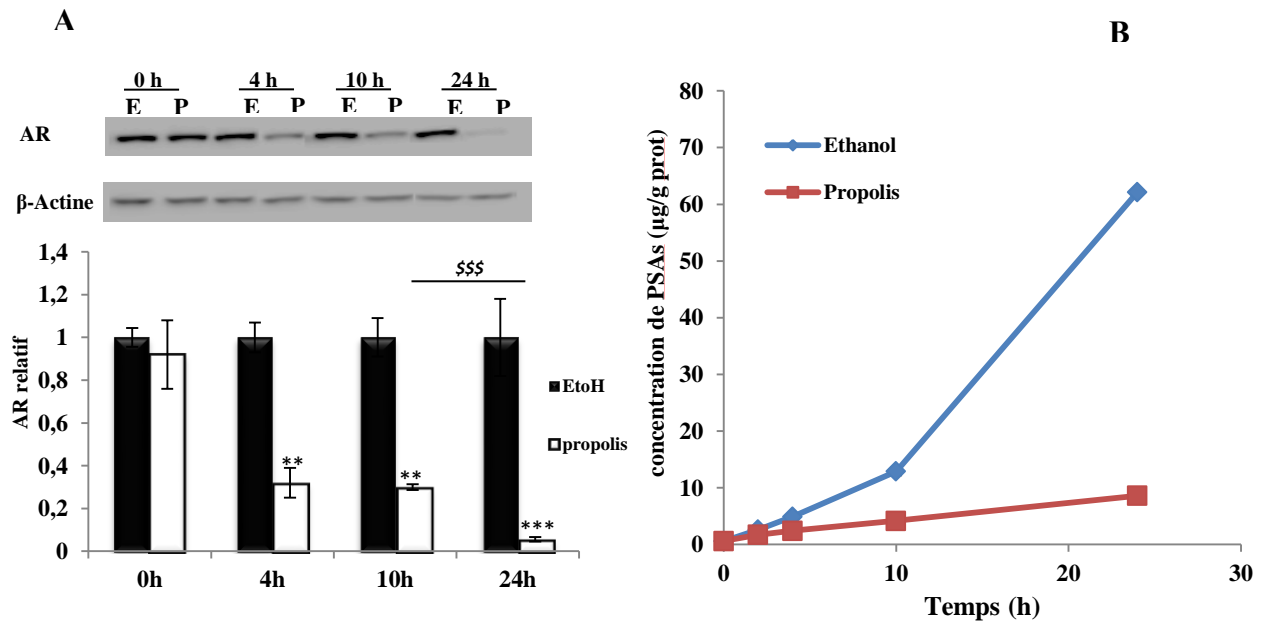


Fig.30 Effet de l'extrait de propolis (0,04 mg/ml) sur l'accumulation du récepteur des androgènes (AR) (A) et les concentrations de PSA dans le milieu de culture (B) sur les cellules LNCaP. E= éthanol, P= propolis. N=3. Test-*t* de Student ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; \$\$\$ $p < 0,001$.

III.2.4. La propolis diminue l'expression des gènes cibles de AR

En plus de la mesure des taux du PSA sécrété par les cellules LNCaP, nous avons aussi étudié l'expression de deux autres gènes cibles de AR qui sont SGK1 et FKBP5 mesurée par RT-qPCR.

Nous avons traité les cellules LNCaP avec la propolis (0,04 mg/ml), la DHT (10^{-8} M) qui est un agoniste naturel de AR et l'association propolis-DHT, puis étudié l'expression des ARNm des deux gènes après 2 h, 4 h, 10 h et 24 h de traitement.

Les résultats de la figure 31 montrent que la propolis induit une diminution très significative de l'expression de SGK1 après 4 h et de FKBP5 après 10 h de traitement.

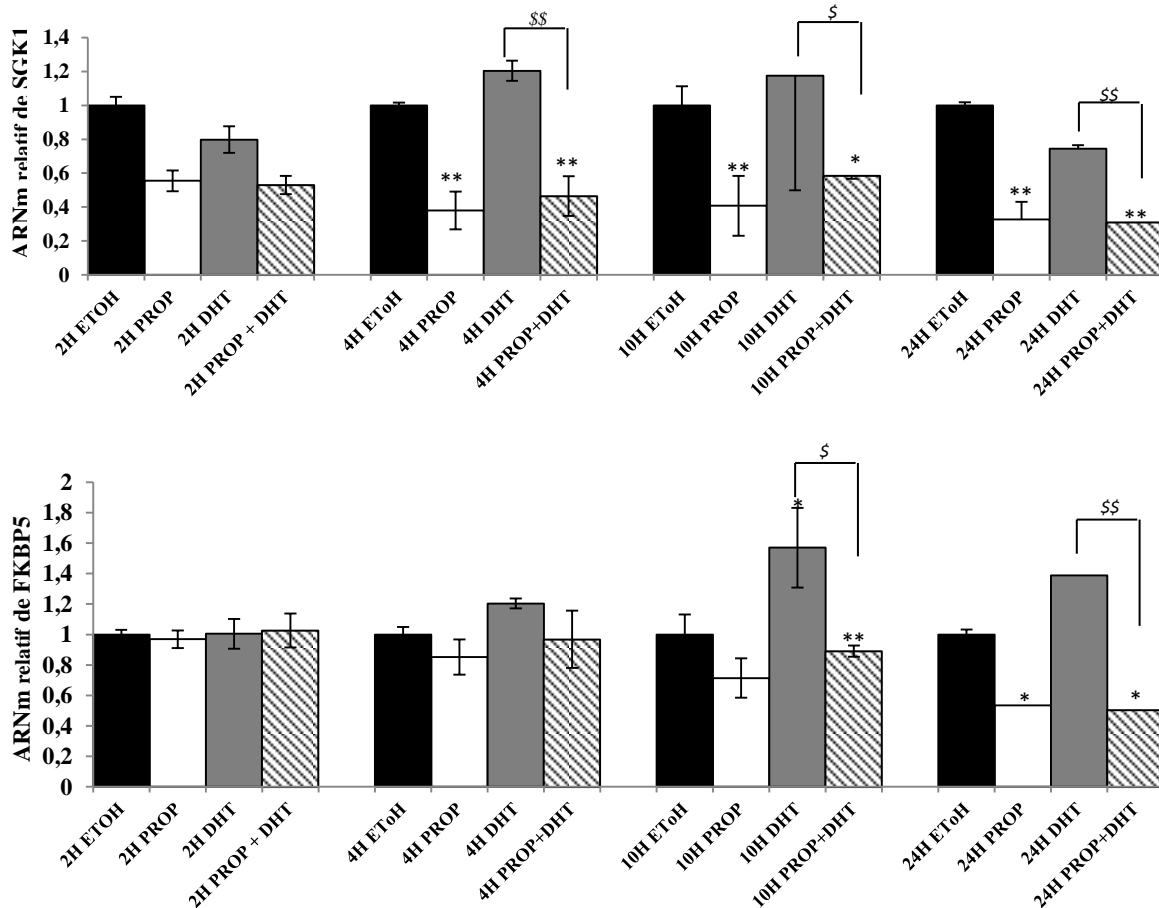


Fig.31 La propolis module les effets des androgènes sur leurs gènes cibles, SGK1 et FKBP5, dans les cellules LNCaP traitées avec la propolis (0,04 mg/ml) et/ou la DHT (10^{-8} M). N=3. Test-*t* de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$.

III.2.5. La propolis est un antagoniste de AR

Pour confirmer les résultats de la qPCR sur les gènes cibles de AR qui suggéraient l'existence d'un effet antagoniste de la propolis, nous avons réalisé une co-transfection d'un plasmide contenant un ARE tk-luc et le récepteur des androgènes (AR) dans les cellules HeLa en présence de la propolis à différentes concentrations et la DHT (10^{-8} M) ou le R1881 (10^{-7} M). Une diminution très significative ($p < 0,01$) de l'activité luciférase a été observée lorsque les cellules ont été traitées par la propolis 0,05 mg/ml. En présence de la DHT ou le R1881, la propolis induit une inhibition de l'effet des deux agonistes DHT et R1881 à une IC₅₀ égale à 0,005 mg/ml (Fig.32 A1) et 0,008 mg/ml respectivement (Fig.32 A2).

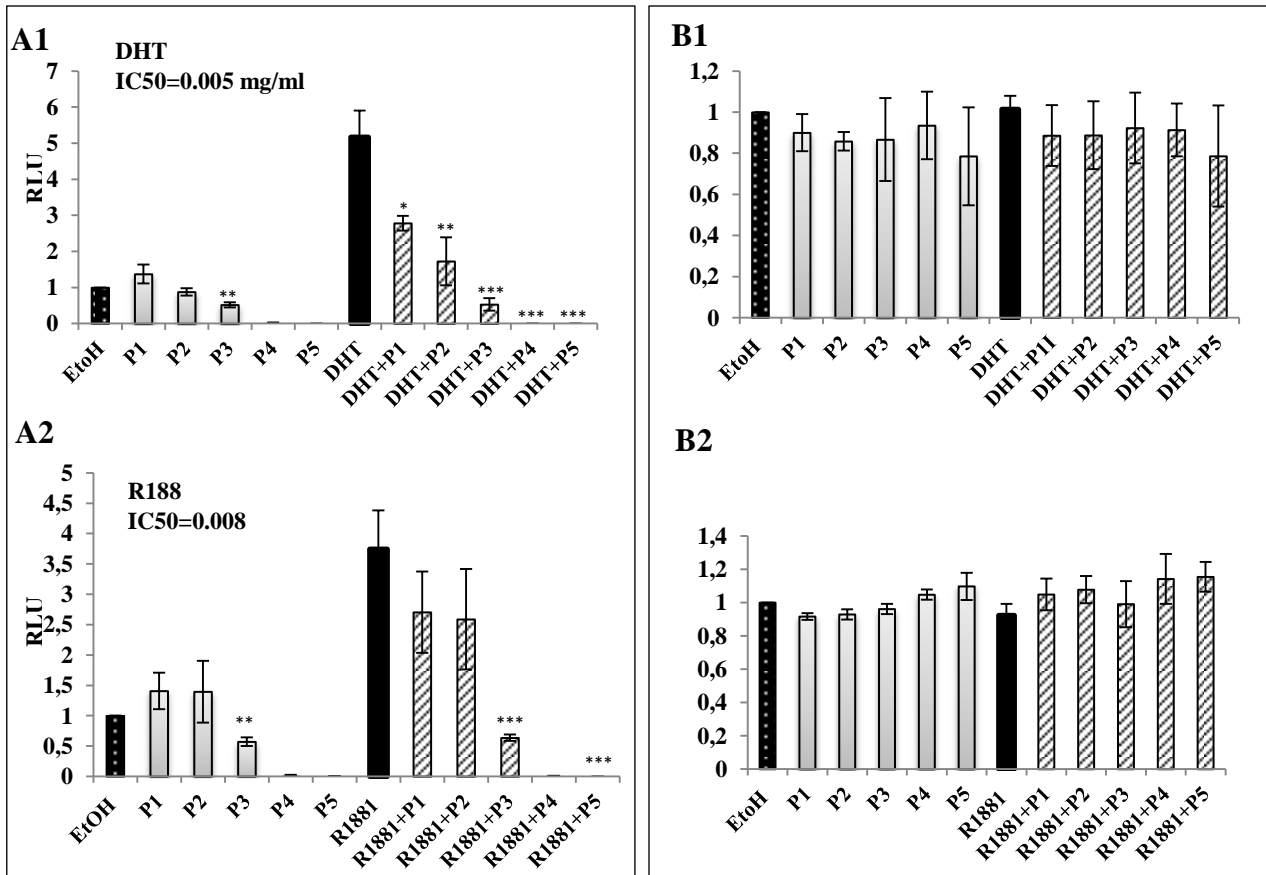


Fig.32 Activité luciférase d'un gène rapporteur contenant un ARE-tk luc co-transfecté avec AR dans les cellules HeLa traitées par la propolis et/ou la DHT (10^{-8} M) (A1), la propolis et/ou le R1881 (10^{-7} M) (A2) et activité luciférase d'un gène rapporteur témoin contenant simplement tk-luc co-transfecté avec AR dans les cellules HeLa traitées par la propolis et/ou la DHT (10^{-8} M) (B1), la propolis et/ou le R1881 (10^{-7} M) (B2) N=3, Test-*t* de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. P1 (propolis 0,005 mg/ml), P2 (propolis 0,01 mg/ml), P3 (propolis 0,05 mg/ml), P4 (propolis 0,01 mg/ml) et P5 (propolis 0,5 mg/ml).

Le traitement des cellules HeLa co-transfectées par un gène rapporteur contenant le tk-luc sans ARE et le récepteur des androgènes par la propolis à des concentrations croissantes, la DHT (10^{-8} M) ou le R1881 (10^{-7} M) ou association propolis-DHT (fig.32 B1), propolis-R1881 (Fig.32 B2) n'induit aucune modification significative de l'activité luciférase ce qui confirme les résultats obtenus que les extraits de propolis contiennent un ligand antagoniste potentiel de AR.

III.3. Discussion

Au cours des dernières années, la compréhension de la biologie tumorale a considérablement modifié le paradigme de la thérapie du cancer et a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouvelles méthodes et agents thérapeutiques (Amini-Sarteshnizi et al., 2015). Les produits naturels continuent d'être une source excellente et fiable pour le développement peu coûteux de nouveaux médicaments anticancéreux. La propolis et ses composés possèdent un fort potentiel antitumoral (Zabaiou et al. 2017). De nombreuses études rapportent que différents types d'extraits de propolis inhibent significativement la croissance cellulaire et réduit la prolifération ou la différenciation de cellules tumorales de diverses origines (Salim et al., 2015).

Dans notre étude, nous avons étudié les effets de la propolis de Jijel sur la prolifération des cellules LNCaP en culture. Par le test MTT et à différents temps d'incubation, nous avons montré que cette propolis possède un effet antiprolifératif contre les cellules LNCaP avec une IC50 égale à 0,04 mg/ml. Ceci est en accord avec les résultats obtenus avec diverses propolis et sur différentes lignées cellulaires de cancer (revue dans Zabaiou et al. 2017).

Par exemple, il a été montré que l'extrait éthanolique de la propolis brésilienne inhibe la prolifération des cellules du cancer de la prostate en culture et que l'extrait méthanolique de la propolis rouge brésilienne induit une réduction de 100 % de la survie des cellules du cancer pancréatique PANC-1 (Awale et al., 2008). La propolis du Chili est capable d'inhiber la prolifération des cellules du cancer de la prostate DU-145 et aussi des cellules de cancer épidermoïdes KB et d'adénocarcinome colorectal Caco-2 (Russo et al., 2004). Celle du Mexique possède un effet antiprolifératif contre les cellules du cancer colorectal murin 26-L5, des cellules du mélanome B16-BL6 et des cellules du cancer de poumons humain A549 (Li et al., 2010). Moraes et al. (Moraes et al., 2010), ont aussi montré que l'extrait éthanolique de la propolis brésilienne induit une très forte inhibition des cellules du cancer de la prostate humain RC-58T/h/SA#4. L'extrait éthanolique de la propolis turque possède une forte activité cytotoxique démontrée sur les cellules PC-3 du cancer de la prostate hormono-résistant (IC 50= 20,7 ± 3,4 µg/ml) (Turan et al., 2015). Czyżewska et al. (Czyżewska et al., 2016) ont montré que cet extrait éthanolique est aussi cytotoxique pour les cellules CAL-27 du carcinome oral en fonction de la dose.

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui se déroule dans des conditions physiologiques normales mais aussi pathologiques. L'inhibition de l'apoptose est un facteur

pathophysiologique critique qui contribue à l'apparition et à la progression du cancer de la prostate, mais les mécanismes moléculaires ne sont pas entièrement compris. Par conséquent, la dérégulation du (des) mécanisme (s) de l'apoptose pourrait être à la base du développement de cellules tumorales résistantes à l'apoptose, comme le cancer de la prostate (Salemi et al., 2014). Les résultats de notre étude sur l'effet de la propolis jijelienne sur l'apoptose et le cycle cellulaire confirment l'effet antiprolifératif et antitumoral de la propolis obtenu par le test MTT. Notre extrait de la propolis induit un arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase G0/G1, une diminution du nombre des cellules au niveau de la phase S et une augmentation des niveaux de cPARP déterminée par western blot dans les cellules LNCaP du cancer de la prostate.

L'induction de l'apoptose a été proposée par Aso et al. (Aso et al., 2004) comme étant l'un des mécanismes qui expliquent l'effet antiprolifératif de la propolis. Elle peut se faire par voie intrinsèque ou extrinsèque.

PARP est une protéine présente dans le noyau et qui catalyse le transfert de la fraction ADP-ribose du NAD⁺. Une fois activée, la caspase- 3 clive PARP et génère le fragment de PARP clivé (Dhandayuthapani et al., 2015). Le clivage de PARP a été détecté dans les cellules apoptotiques exposées à différents agents antinéoplasiques comme l'adriamycine, les agents alkylants, la cisplatine, la mitomycine et les inhibiteurs de la topoisomérase (Chen et al., 2004). Le traitement également des cellules LNCaP avec l'isochahulactone ligane qui est un inhibiteur de la prolifération cellulaire et un inducteur de l'apoptose de plusieurs lignées cellulaires, augmente le clivage de PARP-1 (Chiu et al., 2011).

L'induction de l'apoptose par la propolis peut aussi se faire par l'activation des récepteurs de mort membranaires. Szliszka et al. (Szliszka et al., 2009) ont montré que l'extrait éthanolique de la propolis augmente d'une manière significative l'apoptose à travers le ligand TRAIL dans les cellules Hela.

Parmi les molécules présentes dans notre propolis, figurent l'acide méthyle caféique (CAPE) et la pinocembrine. Lin et al. (Lin et al., 2015) ont montré que le traitement des cellules LNCaP 104-R1, DU-145 et C4-2 CRPC par le CAPE réduit la survie cellulaire et la prolifération via l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2/M. Il réduit les niveaux des protéines Skp2, Cdk2, Cdk4, Cdk7, Rb, phospho-Rb S807/811 et cycline A. Dans leur étude sur les cellules LNCaP et PC3, Chen et al., (Chen et al., 2013) ont montré que

la pinocembrine induit significativement l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et G2/M.

Le récepteur des androgènes joue un rôle primordial pas seulement dans les processus d'initiation et de croissance du cancer de la prostate mais aussi dans la réponse au traitement. Les molécules capables d'inhiber la production de AR et bloquent la signalisation de AR sont d'un grand intérêt pour la chimio-prévention et la chimiothérapie durant toutes les étapes de la cancérogénèse prostatique (Kai et Lvenson, 2011).

Nos résultats ont montré que l'extrait de la propolis de Jijel induit une réduction significative ($p < 0,05$) de l'accumulation de AR mesurée par western blot après seulement 4 h de traitement par la propolis (0,04 mg/ml). L'extrait de propolis induit aussi une diminution significative ($p < 0,05$) des niveaux de PSA (*Antigène Spécifique de la Prostate*) qui est un gène cible de AR, mesurée par Elisa et sécrétée par les cellules LNCaP dans le milieu de culture.

La diminution des niveaux protéiques de AR et de son gène cible PSA nous a conduit à penser que notre extrait de propolis possède un effet anti-androgénique (antagoniste de AR). Un agoniste de AR (anti-androgène) peut être défini comme étant tout composé possédant un effet biologique de blocage ou de suppression de l'action des androgènes (Grant et Ramasamy, 2012).

Pour confirmer donc cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'extrait de propolis sur l'accumulation des ARNm de deux gènes cibles de AR qui sont : FKBP5 et SGK1 et par la co-transfection de plasmide contenant des éléments de réponse aux androgènes (ARE-tk luc) et AR dans les cellules HeLa en présence de la propolis et de deux agonistes de AR : la DHT (10^{-8} M) et le R1881 (10^{-7} M). Nous avons montré que la propolis de Jijel induit la diminution de l'expression des gènes cibles de AR en fonction du temps et aussi une diminution de l'activité luciférase même en présence de la DHT et du R1881 en fonction de la dose.

Cet effet obtenu sur AR et ses gènes cibles peut être dû aux différentes molécules présentes dans la propolis principalement les flavonoïdes. La quercétine ainsi que d'autres molécules de la propolis, peuvent être responsables du résultat obtenu. En étudiant l'effet des flavonoïdes sur les cellules LNCaP, Han et al. (Han et al., 2007) ont montré que la quercétine, le kaempférol et la naringénine inhibent la sécrétion du PSA et en utilisant la transfection d'un gène rapporteur de AR dans les cellules LNCaP, ils ont pu montrer que la quercétine et le kaempférol sont tous les deux des antagonistes de AR. Dans d'autres études Xing et al.,

2001 ; Yuan et al., 2005 ont montré que la quercétine induit la diminution de l'expression des ARNm de deux gènes cibles de AR : PSA et KLK2, alors que le kaempférol diminue ceux du PSA et de la 5 α -réductase (Gasmi et Sanderson, 2010). Le traitement des cellules LNCaP avec de la quercétine diminue la quantité de AR au niveau protéique en une manière dose dépendante et régule négativement l'ARNm de trois gènes cibles de AR qui sont le PSA, NKx3.1 et l'ornithine décarboxylase (ODC) (Xing et al., 2001).

III.4. Conclusion

Nos travaux démontrent pour la première fois que la propolis interfère avec la signalisation du récepteur des androgènes. Elle se lie sans doute à AR, diminue la quantité de AR au niveau protéique, induit l'apoptose et diminue la survie cellulaire des cellules LNCaP. Des tests *in vivo* avec des souris immunodéprimées et xénotreffées avec des cellules LNCaP vont être réalisés. Ces souris seront traitées par gavage avec de la propolis, le véhicule (la méthylcellulose) et un anti-androgène témoin, le bicalutamide pendant 2 à 3 semaines.

Conclusion
&
Perspectives

Conclusion

La problématique de notre thèse était d'étudier deux pathologies prostatiques, l'hypertrophie bénigne de la prostate et le cancer de la prostate.

Par une étude clinique et une étude *in vivo* sur les rats Wistar albinos, nous avons pu démontrer que la physiopathologie de l'HBP est associée au stress oxydatif et que ce dernier est probablement l'une des causes principales conduisant au développement et à la promotion de l'HBP.

Nous avons aussi étudié l'effet de l'extrait de propolis jijelienne sur le cancer de la prostate :

i) In vivo, sur un modèle animal de *carcinogenèse* prostatique chimique induite par le benzo(a)pyrène [B(a)P] et *in vitro*, chez les cellules LNCaP du cancer de la prostate hormono-dépendant.

Le B(a)P induit le développement du cancer de la prostate chez le rat Wistar. Il induit l'expression constitutive de AhR et du CYP1A1.

La propolis entraîne une diminution de la prolifération cellulaire après 21 jours de traitement. Cette diminution de la prolifération est accompagnée d'une inhibition significative de l'expression de AhR.

ii) In vitro, l'extrait de propolis réduit aussi la prolifération des cellules LNCaP en culture étudiée par test MTT. Elle provoque leur apoptose et bloque le cycle cellulaire au niveau de la phase G0/G1. La propolis diminue la quantité de AR en protéines et bloque la signalisation de AR en jouant le rôle d'antagoniste.

Perspectives

Les perspectives de ce travail de recherche sont multiples mais nous avons choisi de nous concentrer sur deux points :

1. Quels sont les effets moléculaires du B(a)P sur la prostate ?

Nous proposons d'étudier les voies moléculaires activées ou inhibées par le B(a)P en réalisant :

- les dosages sériques des stéroïdes (androgènes et estrogènes) chez les rats traités afin de visualiser un éventuel effet de perturbation endocrinienne du B(a)P, et d'analyser les gènes cibles impliqués dans la progression tumorale dépendante des androgènes et des estrogènes ;
- l'interaction avec la voie des androgènes pourra être établie avec un anti-androgène utilisé en thérapie humaine ;
- le B(a)P cible également d'autres organes. Il serait intéressant d'analyser d'éventuels effets de cette molécule sur la dissémination métastatique du cancer de la prostate (ganglions lymphatiques, poumons, cerveau, os) en recherchant des marqueurs de cellules de prostate par immunohistochimie.

2. Quels sont les effets *in vivo* de la propolis jijélienne ?

- des souris immunodéficientes seront xéno greffées avec des cellules LNCaP. Une fois la greffe prise, les souris seront distribuées en trois lots et traitées par gavage par : l'excipient (methylcellulose 0.5 %), la propolis à 20 mg/kg, et le bicalutamide (un anti-androgène servant de témoin) pendant 2 à 3 semaines, 3 fois par semaine, et le volume tumoral mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. Les tumeurs seront ensuite prélevées ; l'apoptose et la prolifération seront analysées par les méthodes classiques d'histologie et de biologie moléculaires. La voie de signalisation des androgènes sera également étudiée ;
- il semble indispensable d'identifier les molécules bioactives de la propolis par criblage moléculaire. Ce travail sera réalisé sur les cellules LNCaP après épuisement de l'extrait alcoolique de propolis de Jijel.

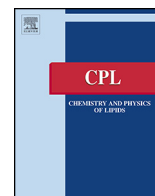
Annexe 1



Contents lists available at ScienceDirect

Chemistry and Physics of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphyslip



Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product

Nada Zabaïou^{a,b,c}, Allan Fouache^{a,b}, Amalia Trousson^{a,b}, Silvère Baron^{a,b}, Amar Zellaoui^d, Mesbah Lahouel^{c,*}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{a,b,**}

^a Université Clermont Auvergne, GREd, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, 28, place Henri Dunant, BP38, F63001, Clermont-Ferrand, France

^b Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 Boulevard Montalembert, F-63009 Clermont-Ferrand, France

^c Laboratory of Molecular Toxicology, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, Université Mohamed Seddik Ben Yahia, 18000 Jijel, Algeria

^d Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Université Larbi Ben M'hidi, 04000 Oum El Bouaghi, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2017

Received in revised form 5 April 2017

Accepted 10 April 2017

Available online xxx

Keywords:

Propolis

Flavonoids

Prostate cancer

Ethanollic extracts

Traditional therapy

ABSTRACT

Natural products are an interesting source of new therapeutics, especially for cancer therapy as 70% of them have botany origin. Propolis, a resinous mixture that honey bees collect and transform from tree buds, sap flows, or other botanical sources, has been used by ethnobotany and traditional practitioners as early in Egypt as 3000 BCE. Enriched in flavonoids, phenol acids and terpene derivatives, propolis has been widely used for its antibacterial, antifungal and anti-inflammatory properties. Even though it is a challenge to standardize propolis composition, chemical analyses have pointed out interesting molecules that also present anti-oxidant and anti-proliferative properties that are of interest in the field of anti-cancer therapy. This review describes the various geographical origins and compositions of propolis, and analyzes how the main compounds of propolis could modulate cell signaling. A focus is made on the putative use of propolis in prostate cancer.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
1.1. Propolis, an ancient product that has become fashionable	00
1.2. Composition of propolis	00
1.2.1. Gross composition of propolis	00
1.2.2. Geographical origin of propolis and composition	00
2. Biological properties of propolis	00
2.1. Modulation of immune system	00
2.2. Antibacterial and antifungal effects	00
2.3. Antioxidant effect	00
2.3.1. Effect of propolis on neurodegenerative and depressive diseases	00
2.4. Antiproliferative effect	00
2.4.1. Effect of propolis on prostate cancer	00

Abbreviation: DHT, 5 α -dihydrotestosterone; ABCA1, ATP-binding cassette A1; AR, androgen receptor; cIAP-2, baculoviral IAP repeat-containing protein3; Bax, Bcl-2-associated X protein; CAPE, caffeic acid phenethyl ester; ERK, extracellular signal-regulated kinases; IL1- β , interleukin 1- β ; LXRs, liver X receptors; MMP, matrix metalloproteinases; NF κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TLR, toll-like receptor; p70S6K, ribosomal protein S6 kinase beta-1; cTAP-1, transporter associated with antigen processing 1; TNF α , tumor necrosis factor α ; TRAIL, tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand; u-PA, urokinase-type plasminogen activator; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein.

* Corresponding author at: Université Mohamed Seddik Ben Yahia, Laboratory of Molecular Toxicology, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University of Jijel, 98 Ouled Aissa, 18000 Jijel, Algeria.

** Corresponding author at: Université Clermont Auvergne, GREd, 10 Avenue Blaise Pascal, Campus Universitaire des Cézeaux, CS60026, F-63178 Aubiere, France.

E-mail addresses: lahouelmesbah@yahoo.fr (M. Lahouel), j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr (J.-M.A. Lobaccaro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>

0009-3084/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

2.5. Use of propolis as adjuvant in cancer therapy	00
3. Conclusion	00
Funding	00
Conflict of interest	00
References	00

1. Introduction

1.1. Propolis, an ancient product that has become fashionable

Propolis, also called bee glue is a natural complex matrix that is synthesized by honeybees from products collected in tree buds, saps, resins, mucilages, lattices and other plant sources. The word propolis is derived from Greek, in which pro stands for “at the entrance to” and polis for “city”, indicating this natural product is used in hive defense. Due to its waxy nature and mechanical properties, propolis is used by honeybees as cement to keep moisture and temperature stable in the hive all year around, and to seal cracks or open spaces. At elevated temperatures, propolis is soft, pliable and very sticky; however, when cooled, and particularly when frozen or at near freezing, it becomes hard and brittle. It will remain brittle after such treatment even at higher temperatures (Sforcin, 2016).

Since antiquity, mankind has been using propolis in different fields, mainly traditional medicine (Havsteen, 1983; Burdock, 1998). In ancient Greece, propolis was used as a disinfectant and antiseptic for cutaneous and buccal infections. The Egyptians used it mainly to embalm their cadavers. The use of propolis has then been developed over the time. Nowadays, the development of researches on propolis is mainly related to the development of chemistry and analytical methods that allowed analyzing its chemical composition.

The composition of propolis depends on the source of the various trees used by honeybees: generally poplar trees in the temperate zones, *Betula* in the Northern, *Dalechampia* in the Equatorial regions, *Clusia* in Venezuela and *Xanthorrhoea* in Australia (Burdock, 1998). Chemical heterogeneity of propolis is thus easily understandable as it is a complex mixture of compounds derived from various plants and processed by salivary enzymes of bees. Hence, composition of propolis depends of the plants, the seasons resins are collected, and the bee species. This chemical diversity brings a crucial question of standardization, even though bees, by themselves, do not change its chemical composition (Bankova et al., 2000).

1.2. Composition of propolis

As presented above, various types of propolis have been reported according to the geographical areas of production, botanical sources and chemical compositions (Bankova, 2005a). The temperate zone propolis is generally referred as poplar propolis because mainly produced from the bud exudates of *Populus* trees (Popova et al., 2004). Birch propolis is found specifically in Russia and is different from poplar propolis (Christov et al., 2006). Pacific propolis is a type of propolis found in Taiwan, Japan and Solomon Island (Popova et al., 2009). Various forms of Brazilian propolis are available: green propolis is derived from *Baccharis dracunculifolia* (Righi et al., 2011) while brown propolis comes from *Copaifera* species (Sawaya et al., 2006) and red propolis is obtained from *Dalbergia ecastophyllum* (L) (Piccinelli et al., 2011).

1.2.1. Gross composition of propolis

Propolis sample analyses from various parts of the world have been collectively reported to contain over 300 different chemical

compounds (Huang et al., 2014). Raw propolis is typically composed of 50% plant resins, 30% waxes, 10% essential and aromatic oils, 5% pollens and 5% other organic substances (Bankova, 2005a). Through various high throughput techniques such as mass spectroscopy, nuclear magnetic resonance, gas chromatography coupled with mass spectroscopy, it has been possible to identify several families of chemically active compounds (For a review (Bankova, 2005b)) but not to define a minimal common composition with clear concentrations of the various compounds. Nevertheless, the main chemical groups present in propolis resin comprise phenolic acids or their esters, flavonoids, terpenes, aromatic aldehydes and alcohols, fatty acids, stilbens and β -steroids (Watanabe et al., 2011).

Flavonoids are the main compounds of propolis as they are responsible for the main pharmacological (see below). Among them it could be found flavones (luteolin), flavonols (quercetins and derivatives), flavanones (pinocembrin, or 5,7-dihydroxyflavone, and derivatives, and naringenin), flavanonols (garbanzol and alnustinol), chalcones and dihydrochalcones, isoflavones (calycosin), isodihydroflavones (daidzein), flavans, isoflavans (vestitol and derivatives) and neoflavonoids (homopterocarpin and medicarpin) (for an extended review (Bankova, 2005b)).

Terpenoids, even though presented in only 10%, are responsible for the odor, because they are volatile components of plants, and also contribute for the biological properties of propolis. Terpenoids include monoterpenes (terpineol, camphor), diterpenes (the main group, such as ferruginol, junicedric acid and derivatives, pimarinic acid, totarolone), triterpenes (such as lupeol and derivatives, lanosterol, amyrone and derivatives) and sesquiterpenes (such γ -elemene, valencene, α -ylangene, α -bisabolol) (Table 1).

Phenolic compounds include various acids such as cinnamic, p-coumaric, chicoric, caffeic and fulvic acids (For a review (Bankova, 2005b)).

1.2.2. Geographical origin of propolis and composition

This overview of propolis composition obviously depends of the area of collection. For example propolis samples from Europe, North America and other temperate zones are mainly composed of flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, quercetin, chrysin and galangin), phenolic acids and their esters (Falcão et al., 2010), likewise poplar propolis (Falcão et al., 2010; Sun et al., 2012).

Mediterranean propolis is characteristic by the high concentration of terpenoids and is found in many regions like Greece (Popova et al., 2010; Celemlı et al., 2013), Switzerland (Bankova et al., 2002), Malta (Popova et al., 2011), Turkey (Duran et al., 2011; Silici et al., 2007) and Algeria (Piccinelli et al., 2013). Among these, Algerian one is derived from two principal species *Populus spp* and *Citrus spp* and is composed of pinocembrin, chicoric and caffeic acids and their esters, galangin (Boutabet et al., 2011), diterpenic acids, flavonols like chrysin, and aromatic acids (Piccinelli et al., 2013). In Greece, propolis is rich of flavonoids and diterpenic acids (Popova et al., 2010). *Populous spp* and *eucapypptus* are the main plant sources of Turkish propolis. Its composition is not different from that of Algeria and Greece with caffeic acid and its esters, pinobanksin, pinocembrin, diterpenic acids, aromatic acids and flavonols (Duran et al., 2011).

Many studies with African propolis from different regions like Kenya, Cameroon, Congo and Ethiopia, showed that triterpenoids

Table 1

Main characteristics of the described propolis.

Geographical origin	Major compounds	Biological properties	Reference
Temperate zones Poplar propolis	flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, quercetin, chrysin, galangin), phenolic acids and esters	–	Falcão et al. (2010), Sun et al. (2012)
Algeria	diterpenic acids, chrysin, aromatic acids pinocembrin, chicoric, caffeic acids and esters, galangin	Antiproliferation Anti UV Antimetastasis	Piccinelli et al. (2013), Boutabet et al. (2011), Segueni et al. (2011), Benguedouar et al. (2016)
Brazil (red and green)	prenylated phenylpropanoids, caffeoyl quinic acids, phenolic acids, p-coumaric acids, diterpenic acids, kaempferide, isosakuranetin, formononetin, isoliquiritigenin, biochanin A, apigenin	Antibacteria Antifungus Antioxidant Antiinflammation Antiangiogenic effects Antitumoral Cholesterol homeostasis Depression Anxiety Alzheimer's disease	Bankova et al. (2000), Bankova, (2005), Frozza et al. (2013), Park et al. (2002), da Silva Frozza et al. (2016), Silva et al. (2008), Alencar et al. (2007), de Mendonça et al. (2015), Machado et al. (2016), Righi et al. (2011), Bazo et al. (2002), Li et al. (2007), Iio et al., (2012), Reis et al. (2014), da Silveira et al. (2016)
China	–	Alzheimer's disease	Chen et al. (2008)
Cuba (red)	–	Antioxidant	Claus et al. (2000)
Egypt	–	Antioxidant	Salim et al. (2015)
Greece	flavonoids, dipertenic acids	Antiproliferative	Popova et al. (2010), Celemlı et al. (2013)
Iran	–	Cytotoxic effects on cancer cells Inhibition of cancer cell proliferation	Amini-Sarteshnizi et al. (2015), Alizadeh et al. (2015),
Kenya, Cameroon, Congo, Ethiopia	triterpenoids	Antibacteria Antifungus	Papachroni et al. (2015), Petrova et al. (2010), Popova et al. (2013), Rushdi et al. (2014)
Korean	–	Depression	Lee et al. (2013)
Malta	–	–	Popova et al. (2011)
Poland	terpenoids	Inhibition of cancer cell proliferation	Kubina et al. (2015)
Portugal	–	Free radical scavenging Anti-lipid peroxidation	Miguel et al. (2010), Valente et al. (2011)
Switzerland	terpenoids	–	Bankova et al. (2002)
Thailand	–	Antiproliferation	Khacha-ananda et al. (2013)
Turkey	terpenoids	Cytotoxic effects on cancer cells Antioxidant	Duran et al. (2011), Silici et al. (2007), Turan et al. (2015), Barlak et al. (2011)

Refer to the main text to have more information.

are the major chemical components (Papachroni et al., 2015; Petrova et al., 2010; Popova et al., 2013; Rushdi et al., 2014).

Propolis from tropical areas like Brazil is composed essentially by prenylated phenylpropanoids and caffeoyl quinic acids (Bankova et al., 2000). In Brazil, Park et al. (Park et al., 2002) have identified and classified 13 different types of propolis based on their physicochemical characteristics. Green and red propolis are the most common types of Brazilian propolis extracted from *Baccharis spp.*, *Dalbergia ecastaphyllum*, *Betula verrucosa*, *Betula pendula* and *Betula pubescens*, and are composed of prenylated phenylpropanoids, phenolic acids, p-coumaric acids, diterpenic acids, kaempferide, isosakuranetin, formononetin, isoliquiritigenin, biochanin A and apigenin (Bankova, 2005a; Frozza et al., 2013; Park et al., 2002; Silva et al., 2008; da Silva Frozza et al., 2016).

2. Biological properties of propolis

As previously presented, it is difficult to speak of “one” propolis but it should rather be presented “thousands” of propolis, due to the various origins, seasons collect, surrounding trees and flowers, genetics of bees, treatments of the collected propolis, methods of extractions. Indeed, the use of different solvents for the molecule extraction changes activity of main biologically active constituents in propolis (Table 1). As indicated in the previous chapters, flavonoids, terpenoids and phenolic esters of propolis are responsible for its potential effects with specific reagents (Wagh, 2013). It should also be noted that expect few *in vivo* studies, some of them presented above, the majority was performed in cell culture using crude extracts, which raises the question of propolis

composition but facilitates the deciphering of the molecular mechanism. On the other hand, *in vivo* experiments with animals fed various propolis do not indicate what specific compounds is really active or whether a mix of compounds could have a synergistic activity, and more importantly which transformed or not derivatives really reach the target organ. Despite these important points, many properties have been associated to propolis at the cellular and molecular levels (Fig. 1).

2.1. Modulation of immune system

Aqueous extract of propolis modulates macrophage antitumoral activity in mice and increases the production of lymphocyte activation factors (Orsolić et al., 2004). Ethanolic extract of Brazilian propolis enhances natural killers (NK) cells activity against lymphoma in rats (Sforzin, 2007). Orsatti et al. (Orsatti et al., 2010) have shown that ethanolic extract of Brazilian green propolis up regulates the expression of toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 and the production of interleukines (IL)-1 β in BALB/C mice after 3 days of treatment. Brazilian propolis also modulates the effect of macrophages in killing the parasites of *Leishmania braziliensis*. This propolis also increased the production of tumor necrosis factor (TNF) α in pretreated mice (da Silva et al., 2013).

Water extract of propolis induces the *in vitro* production of IL-1 by peritoneal macrophages (Dimov et al., 1992). Sampietro et al. (Quiroga et al., 2006; Sampietro et al., 2016) demonstrated that partially purified propolis extracts stimulate neutrophil chemotactic activity at various concentrations suggesting its possible use for patients suffering of neutrophil dysfunction.

2.2. Antibacterian and antifungal effects

Using ethanolic extract of Kenian propolis, Muli and Maingi (2007) have shown significant differences in the antibacterian activities among three studied geographical areas, depending on the tested microorganisms (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) after 24 h of treatment.

Brazilian ethanolic extract of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian stingless bees showed significant effects against *S. aureus*, *E. coli* and *Enterococcus sp.* Using the disc diffusion method, Rahman et al. (Rahman et al., 2010) evaluated the antibacterial activity of Canadian propolis against *S. aureus* and *E. coli*. Result showed that *S. aureus* is more susceptible to propolis than *E. coli*.

Propolis extract has also a potential antifungal effect. Flavonoids from Maringa (Brazil) induce cellular death of 3 yeast species at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$: *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* (Oliveira et al., 2006). Dota et al. (2011) also demonstrated that yeast isolates obtained from vaginal exudates of patients with vulvovaginal candidiasis were inhibited by ethanol extract and propolis microparticles of Brazilian propolis, with small variation independent of the species of yeast.

2.3. Antioxidant effect

The antioxidant activity of propolis is due to its enrichment of polyphenols such as phenolic acids and flavonoids.

In a model of alcohol-induced liver damage, Cuban red propolis seems to have protective effects by inhibiting macrophage

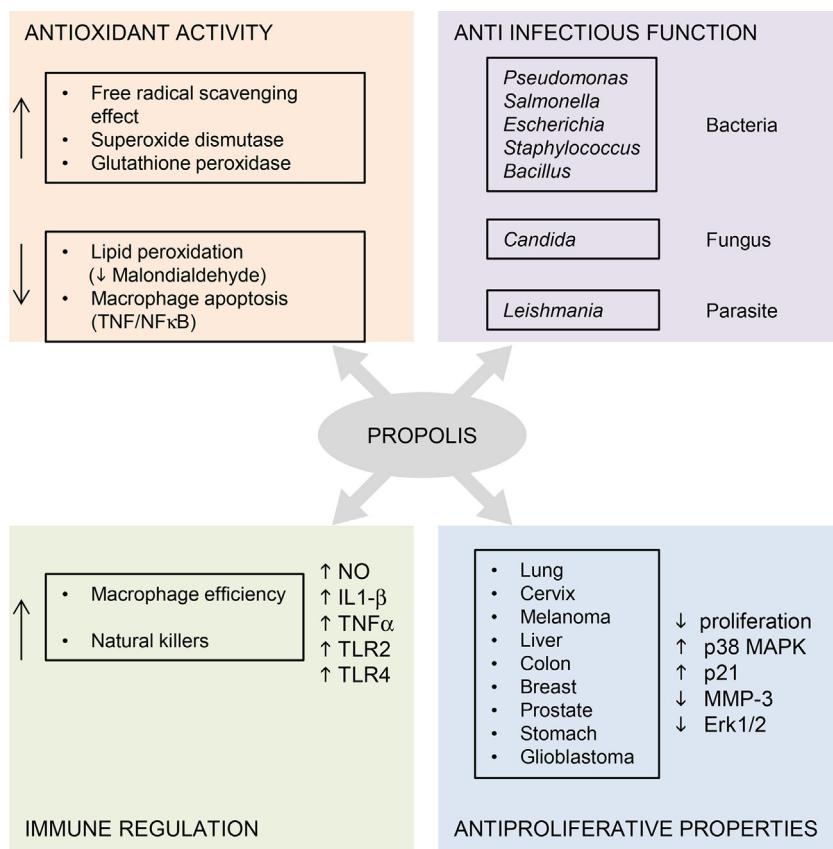


Fig. 1. Schematic representation of propolis activities. ERK, extracellular signal-regulated kinases; IL, interleukin; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; NF κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NO, nitric oxide; p21, CDK-interacting protein 1; TNF, tumor necrosis factor; TLR, toll-like receptor; MMP, matrix metalloproteinases.

apoptosis and modulating TNF/NF κ B pathway (Claus et al., 2000). Portuguese propolis collected in thirteen different areas in the Algarve region during winter and spring are rich in phenols and have an important capacity of scavenging free radicals (Miguel et al., 2010). The antioxidant activity of propolis from Bornes (North East) and Fundão (Centre) regions of Portugal was also demonstrated. Its free radical scavenging effect and protection against lipid peroxidation were evaluated in human erythrocytes and demonstrated as well (Valente et al., 2011).

Antioxidant effect of ethanolic extract of red propolis has been studied on human tumor cell lines SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovary) and HCT-116 (colon). Its enrichment in tanins, catechins, chalcones, aurones, flavonones, flavonols, xanthones, pentacyclic triterpenoids and guttiferones gives it a strong scavenging effect of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (Alencar et al., 2007; de Mendonça et al., 2015). The red propolis of the Northern region of Brazil showed the most potent antioxidant activity compared to green and brown propolis (Machado et al., 2016). However, no molecular mechanism has been described so far by the authors.

Methanolic extract of yellow propolis from Brazil also shows a high antioxidant activity determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and β -carotene/linoleic acid array methods (Righi et al., 2011). Interestingly, ethanolic extract of yellow propolis shows a decrease in the production of nitric oxide and malondialdehyde in 3 month old male Wistar rats, without affecting the levels of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase (da Silveira et al., 2016).

In C57BL/6 mice with acute lung inflammation caused by cigarette smoke, ethanolic extract of green propolis enhances the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase, reduces malondialdehyde levels and decreases glutathione/oxidized glutathione ration (Lopes et al., 2013).

2.3.1. Effect of propolis on neurodegenerative and depressive diseases

Among the various pathologies linked to oxidation troubles, neurodegenerative diseases have a peculiar place as they are usually tardily diagnosed, without any significant curative treatment. In that line propolis has interesting antioxidant properties as already described that could be used as a prophylactic compound, and in some cases considered as potential therapeutic drug compound.

Hence Reis et al. described that oil extract of propolis exerts stimulant, anxiolytic and antidepressant effects on the central nervous system together with antioxidant activity in rats (Reis et al., 2014). Ethanolic extract of Korean propolis also have antidepressant effect by enhancing glucocorticoid receptor function (Lee et al., 2013). Essential oil of Brazilian green propolis, rich on terpenoids, possesses therapeutic effects against anxiety by modulating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Li et al., 2012).

Using human neuroblastoma SH-SY5Y cells, Ni et al. (2017) showed that pretreatment with an identical propolis significantly ameliorates the hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells, significantly reduces reactive oxygen species derived from mitochondria and 8-oxo-2'-deoxyguanosine and significantly reverses β -amyloid accumulation through the modulation of PI3 K pathway. Altogether these data suggest that propolis could protect from neurodegenerative damage in neurons that occurs during Alzheimer's disease and aging (da Silveira et al., 2016). Chinese propolis has also significant activity in the central nervous system. Hence a water-soluble derivative could inhibit acetylcholine esterase activity in the hippocampus of mice treated by scopolamine, which induces learning and memory impairment, showing an interesting effect *in vivo* in amnesia as observed in Alzheimer's disease (Chen et al., 2008). Amyloid- β peptides accumulate in the brain and initiate a cascade of pathologic events in Alzheimer's disease. Interestingly pinocembrin, found enriched in propolis,

inhibits amyloid- β peptide accumulation *in vitro* (Wang et al., 2016) and *in vivo* (Liu et al., 2014).

Parkinson's disease is another widespread neurodegenerative disease associated with the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and decreased striatal dopamine levels. Fontanilla et al. (Fontanilla et al., 2011) reported that caffeic acid phenyl ester (CAPE) attenuated dopaminergic neurodegeneration and dopamine loss in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. The same compound also decreases the signs of amyotrophic lateral sclerosis and increases the survival progression by attenuating both neuroinflammation and motor neuron cell death (Fontanilla et al., 2012). Finally CAPE has also a protective effect against the dopaminergic neuronal loss pharmacologically induced in rats by protecting from cytochrome c release and caspase-3 activation (Barros Silva et al., 2013).

2.4. Antiproliferative effect

Cancer is now the leading cause of death in the world (Jemal et al., 2008). The pharmaceutical industry invests billions of dollars each year in the discovery and development of new molecules and therapeutic approaches. In fact, it is estimated that over 70% of anticancer drugs are natural compounds or related. Example is shown by taxol (paclitaxel) derived from the bark of Pacific yew (*Taxus brevifolia*) or American mandrake (*Podophyllum peltatum*) (Watanabe et al., 2011; de Weger et al., 2014).

Based on its the high concentration in flavonoids, terpenoids and phenolic compounds (for a review on their effects on cancers, see (Bayala et al., 2014)), propolis has been the subject of several studies to point out putative cytotoxic and antiproliferative effects on various *in vivo* and *in vitro* cancer animal models.

Propolis collected from Phayao province in Thailand has a significant antiproliferative effect evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test on an adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549) and a human epitheloid cervix carcinoma cells (HeLa) after 24, 48 and 72 h of treatment in a dose dependent manner (Khacha-ananda et al., 2013).

Chemical analysis of Algerian propolis identified several anticancer phenolic compounds such as galangin (Boutabet et al., 2011) and (+)-chicoric acid, identified in propolis for the first time by Segueni et al. (Segueni et al., 2011). Independently, galangin was shown to induce melanoma cell apoptosis via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (Zhang et al., 2013b) and to inhibit *in vivo* tumor growth and metastasis in a mouse melanoma model (Zhang et al., 2013c). Galangin also reduces melanoma tumor progression/dissemination and induces autophagy and apoptosis (Benguedouar et al., 2016).

Chicoric acid, displayed potent *in vitro* matrix metalloproteinase (MMP)-3 inhibitory activity with IC₅₀ at 6.3×10^{-7} M. In addition, both caffeic acid and (+)-chicoric acid methyl ester present in Algerian propolis significantly inhibit UVA-mediated MMP-3 upregulation by fibroblasts (Segueni et al., 2011).

In Turkey, five human cancer cell lines have been studied. Ethanolic extract of propolis have powerful cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma (HepG2), colon adenocarcinoma (WiDr), HeLa, mammary adenocarcinoma (MCF-7) and prostate adenocarcinoma (PC3) cells. It seems that the highest cytotoxic activity was demonstrated on PC-3 cells with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) at $20.7 \pm 3.4 \mu\text{g/ml}$ (Turan et al., 2015). Likewise, ethanolic extract from Polish propolis inhibits proliferation of human malignant cells of melanoma (Me 45) and colorectal cancer (HCT 116) (Kubina et al., 2015).

Iranian propolis also has a strong cytotoxicity on AGS human gastric cancer cell lines. These extracts inhibited the proliferation of AGS cells with IC₅₀ at 60, 30 and 15 $\mu\text{g/ml}$ after 24, 48 and 72 h

of treatment respectively (Amini-Sarteshnizi et al., 2015). In rats, gastric cancer initiated by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin could be inhibited by ethanolic extracts of Iranian propolis which decreases tumor proliferation and reduces the number of lesions compared to untreated controls (Alizadeh et al., 2015).

Ethanolic extract of Brazilian propolis play a protective action against 1,2 dimethylhydrazin induced colon cancer in rats (Bazo et al., 2002) by suppression of the development of neoplastic lesions. Tumor invasion and metastasis are considered as the main therapeutic challenges in oncology (Zhang et al., 2013a). It was reported that ethanolic extract of Brazilian propolis has an anti-angiogenic effect. This extract reduced the number of newly formed blood vessels and inhibits the proliferation of human umbilical vein endothelial cells through the induction of apoptosis and inactivation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 signaling pathway (Kunimasa et al., 2011).

2.4.1. Effect of propolis on prostate cancer

The risk for a man to have a diagnosed prostate cancer has drastically increased these last years to reach the second leading cause of death from cancer (Jemal et al., 2008). Prostate cancer is an androgen dependent tumor characterized by a very slow development. As for other types of cancer, propolis has also been studied for its activity to decrease proliferation.

In Brazil, Li et al. (2007) demonstrated that ethanolic extract of propolis has an antitumor activity against prostate cancer cell line. This cytotoxicity is due to the regulation of the expression of cyclin D1, B1 and protein p21.

Dimethylsulfoxid and water extracts of Turkish propolis have a very high antioxidant potential. According to Barlak et al. (2011), this property is responsible for the anti-proliferative activity in PC-3 cell line. Ethanolic extract of Egyptian propolis shows a great antioxidant and antiproliferative effect on the same cells by activation of apoptosis through the transcriptional induction of the cellular tumor antigen p53 and the Bcl-2-associated X protein (Bax) (Salim et al., 2015). This extract was more powerful than doxorubicin.

Szliszka et al. (2011a) have shown that one of the mechanisms involved in this cytotoxic effect is the activation of apoptosis through the activation of the tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in both LNCaP and DU-145 cells, which can present an excellent therapeutic target considering that more than 50 percent of the tumor cells are resistant to TRAIL at different levels of the signaling pathways (Zhang et al., 2013a).

Among the numerous compounds found in ethanolic extracts, the main molecules responsible of those effects are flavonoids and CAPE, and many studies have investigated their effects and the mechanisms by which they can intervene (Rosenberg Zand et al., 2002). The potential of CAPE in the treatment of advanced PCa was shown in blocking the migration of androgen-independent cancer cell lines PC-3 and DU-145: besides, CAPE induces receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) in non-canonical Wnt signaling pathway (Tseng et al., 2016).

Acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavon) has an antimetastatic effect on human prostate DU-145 cell lines (Shen et al., 2010). Metastasis is related with the production of matrix proteins in a variety of cells or tissues they encounter (Nam et al., 2016). Acacetin was shown to inhibit the abilities of adhesion, invasion and migration. It could also block the phosphorylation of p38 MAPK, which is involved in the downregulation of MMP-2 and -9 and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) at protein and mRNA levels. Acacetin also reduces nuclear levels of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) and of proto-oncogenes c-Fos and c-Jun (Shen et al., 2010).

Chrysin (5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one) is a flavon known to be a potent inhibitor of aromatase, enzyme responsible for a key step in the biosynthesis of estrogens (Sanderson et al., 2004). Samarghandian et al. (Samarghandian et al., 2011) showed that chrysin decreases proliferation and induces apoptosis in PC-3 human cancer cell lines. Besides, chrysin increases apoptosis of androgen-independent DU145 and PC-3 cancer and blocks their proliferation through the decrease of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K). Moreover the same authors pointed out that chrysin also induces endoplasmic reticulum stress of the cells (Ryu et al., 2017).

Some of the flavonoids affect the cell cycle. For example, phytoestrogen genistein arrests cell cycle at G2/M phases by suppressing the expression of cyclin B and induction of p21 in a p53 independent manner (Kobayashi et al., 2002).

Flavonoid quercetin is also an important molecule. Used at concentrations of 25 and 50 μM quercetin significantly inhibits the growth of PC-3 and DU-145 cells (Nair et al., 2004). According to the authors, this is due to the inhibition of the expression of the oncogenes which control the phases G1, S and G2 of the cell cycle. Interestingly, quercetin does not affect colony formation by LNCaP, a poorly aggressive prostate cancer cell line, or by BG-9, a normal fibroblast cell line.

Pinocembrin exercises a cytotoxic effect and attenuates cell viability of LNCaP, DU-145 and PC-3 cell lines. It induces apoptosis of LNCaP cells and arrests cell cycle at both S and G2/M phases. It is also implicated in the dissipation of mitochondrial membrane potential before culminating in apoptosis in pinocembrin treated LNCaP cells (Chen et al., 2013). Besides, pinocembrin has also an interesting activity of 5α-reductase inhibitor (Komoda, 1989). Indeed, blocking 5α-reductase functioning would decrease the levels of 5α-dihydrotestosterone (DHT), a potent androgen for prostate epithelium growth.

As presented above, CAPE is one of the most powerful phenolic acids of propolis. By inhibition of ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K), an intermediary responsible for the protein synthesis in PI3K/AKT pathway and some AKT signaling networks, CAPE blocks the proliferation of LNCaP, DU-145 and PC-3 cells and reduces the tumor growth of LNCaP xenografts in nude mice (Chuu et al., 2012; Lin et al., 2012). CAPE can also act by inducing apoptosis. In a dose dependent manner, CAPE decreases the expression of the inhibitors of apoptosis: transporter associated with antigen processing 1 (cTAP-1), baculoviral IAP repeat-containing protein3 (cIAP-2) and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) (McEleny et al., 2004).

Hormonotherapy is one of the approaches used for the treatment of prostate cancer. This therapy consists of blocking the signaling of the androgen receptor (AR). Four flavonoids from propolis (myricetin, quercetin, fisetin and kaempferol) were studied for their chemopreventive effects against castration sensitive or castration resistant prostate cancers. Several mechanisms have been proposed to explain the effects: inhibition of 5α-reductase (see above), direct competition with the androgen in binding pocket of AR, disruption of AR interaction with coregulators, and modulation of the PI3K/AKT pathway (Boam, 2015).

Another nuclear receptor signaling pathway could also be modulated by propolis extract. Iio et al. (Iio et al., 2012) pointed out that ethanolic extracts of Brazilian red propolis could increase Abca1 expression, a membrane transporter involved in cholesterol efflux, by modulating the transcriptional activity of the liver X receptors (LXRs). Ligand activation of these nuclear receptors has been associated to the decrease of prostate tumor progression in a xenograft model of LNCaP cells (Pommier et al., 2010) and *in vivo* (Pommier et al., 2013).

2.5. Use of propolis as adjuvant in cancer therapy

The aim of adjuvant treatment is to improve disease-specific symptoms and overall survival. Hence propolis has been shown to potentiate chemotherapeutics and to alleviate their adverse effects (Patel, 2016). For example when aldo-keto reductase AKR1B10, which metabolizes aldehydes and drugs containing carbonyl groups, is highly accumulated it induces inflammation and tumorigenesis by reducing the effects of the chemotherapy. CAPE has proved to be an effective inhibitor of AKR1B10 enzyme and should increase the efficacy of the treatment (Soda et al., 2012). Doxorubicin, which interacts with DNA by intercalation and inhibition of macromolecular biosynthesis, is commonly used to treat some leukemia and Hodgkin's lymphoma, as well as other cancers, e.g., bladder, breast, stomach, lung, ovaries. However side effects are numerous such as the induction of testicular toxicity and thus infertility. In rat model, propolis when co-administered with doxorubicin prevents the adverse effect on testis (Rizk et al., 2014). Likewise, Portuguese propolis has been shown to reinforce paclitaxel effect in estrogen-insensitive MDA-MB-231 cells and androgen-insensitive DU145 cells (Silva-Carvalho et al., 2014). TRAIL initiates in cancer cell death, however highly malignant tumors are often resistant to apoptosis induction by TRAIL, and some cancer cells that were originally sensitive to TRAIL-induced apoptosis can become resistant after repeated exposure (Trivedi and Mishra, 2015). Interestingly bioactive compounds of Brazilian green propolis help in prostate cancer chemoprevention through the enhancement of TRAIL-mediated apoptosis (Szliszka et al., 2011b). These few examples among numerous clearly point out that besides the potential of propolis used as therapeutic agent, its co-administration with already improved treatment is an interesting field of investigation as it will increase the efficacy of chemotherapy as well as will protect of deleterious side effects.

3. Conclusion

The therapeutic use of propolis is definitively an ancient empirical approach (at least 3000 BCE). The richness of chemical compounds of propolis especially the phenolic contents, conferred to it exceptional properties and justifies the numerous studies of various propolis extracts for the putative treatments of numerous pathologies. Based on ethnobotanist observations and traditional practitioners, many properties of this natural product have been explored. Among them cancer therapy is one the most exciting fields since many tumors undergo a therapeutic escape, demonstrating that new therapeutic ways need to be explored. Besides the identification of the compounds responsible for the effects and deciphering their molecular mechanisms, there will be a difficult and long process before using propolis as a routine drug. Indeed the most prominent challenge for a direct use of it will be i) to standardize propolis extracts; ii) to define the galenic formulation; iii) to identify the best route of administration; iv) to select which medical application(s) could be eligible for; and at last v) to choose whether an acute vs. long treatment should be preferred. Nonetheless, this challenge needs to be faced as it will give new insights in cancer biology and treatment as well as signaling pathways.

Funding

Part of this study is supported by specific grants from European Regional Development Fund (FEDER), Auvergne Region, Projet Hubert Curien Tassili 16-MDU-956.

Conflict of interest

We have read and understood the Chemistry and Physics of lipids policy on declaration of interests and declare that N. Zabaïou is recipient of a grant from Projet Hubert Curien (PHC) Tassili 16-MDU-956 and PROFAS-B from the French Embassy in Algeria, A. Fouache is recipient of a doctoral grant from Université Blaise Pascal, part of this work is financed by Auvergne Region, Fond Européen de Développement Régional (FEDER), and PHC Tassili. The funders had no role in the redaction of this review, decision to publish, or preparation of the manuscript. Authors have no competing interest for the submitted review.

References

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J. Ethnopharmacol.* 113, 278–283.
- Alizadeh, A.M., Afrouzan, H., Dinparast-Djadid, N., Sawaya, A.C.H.F., Azizian, S., Hemmati, H.R., Mohagheghi, M.A., Erfani, S.I., 2015. Chemoprotection of MNNG-initiated gastric cancer in rats using Iranian propolis. *Arch. Iran. Med.* 18, 18–23.
- Amini-Sarteshnizi, N., Mobini-Dehkordi, M., Khosravi-Farsani, S., Teimori, H., 2015. Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line. *J. HerbMed Pharmacol.* 29–34.
- Bankova, V.S., de Castro, S.L., Marcucci Maria, C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 3–15.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.-G., 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 57, 530–533.
- Bankova, V.I., 2005a. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114–117.
- Bankova, V., 2005b. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2, 29–32.
- Barlak, Y., Deger, O., Colak, M., Karatayli, S.C., Bozdayi, A.M., Yücesan, F., 2011. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Sci.* 9, 74.
- Barros Silva, R., Santos a, N.G., Martins, N.M., Ferreira a, D.S., Barbosa, F., Oliveira Souza, V.C., Kinoshita, A., Baffa, O., Del-Bel, E., Santos, A.C., 2013. Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience* 233, 86–94.
- Bayala, B., Bassole, I.H., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J.-M.A., Sempore, J., 2014. Anticancer activity of essential oils and their chemical components – a review. *Am. J. Cancer Res.* 4, 591–607.
- Bazo, A.P., Rodrigues, M.A.M., Sforzini, J.M., de Camargo, J.L.V., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., 2002. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22, 183–194.
- Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S.C., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., Antonicelli, F., 2016. Ethanolic extract of algerian propolis and galangin decreased murine melanoma T. *Anticancer Agents Med. Chem.* 16, 1172–1183.
- Boam, T., 2015. Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *Ecancermedicalscience* 9, 585.
- Boutabet, K., Kebbsa, W., Alyane, M., Lahouel, M., 2011. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J. Nephrol.* 21, 101–106.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 36, 347–363.
- Celemlı, O.G., Hatjina, F., Charistos, L., Schiesser, A., Ozkirim, A., 2013. More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 68, 429–438.
- Chen, J., Long, Y., Han, M., Wang, T., Chen, Q., Wang, R.I., 2008. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 441–446.
- Chen, Z., Rasul, A., Zhao, C., Millimouno, F.M., Tsuji, I., Yamamura, T., Iqbal, R., Malhi, M., Li, X., Li, J., 2013. Antiproliferative and apoptotic effects of pinocembrin in human prostate cancer cells. *Bangladesh J. Pharmacol.* 255–263.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Bertrand, M., 2006. Chemical composition of propolis from Canada: its antiviral activity and plant origin. *Nat. Prod. Res.* 20, 531–536.
- Chuu, C.-P., Lin, H.-P., Ciaccio, M.F., Kokontis, J.M., Hause, R.J., Hiipakka, R.A., Liao, S., Jones, R.B., 2012. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 5, 788–797.
- Claus, R., Kinscherf, R., Gehrke, C., Bonaterra, G., Basnet, P., Metz, J., Deigner, H.P., 2000. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittelforschung* 50, 373–379.
- da Silva Frozza, C.O., da Silva Brum, E., Alving, A., Moura, S., Henriques, J.A.P., Roesch-Ely, M., 2016. LC-MS analysis of Hep-2 and Hek-293 cell lines treated with Brazilian red propolis reveals differences in protein expression. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 1073–1084.

- da Silva, S.S., da S, Thomé G., Cataneo, A.H.D., Miranda, M.M., Felipe, I., de J, Andrade C.G.T., Watanabe, M.A.E., Piana, G.M., Sforcin, J.M., Pavanelli, W.R., et al., 2013. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 673058 (ECAM).
- da Silveira, C.C.S., de, M., Fernandes, L.M.P., Silva, M.L., Luz, D.A., Gomes, A.R.Q., Monteiro, M.C., Machado, C.S., Torres, Y.R., de Lira, T.O., Ferreira, A.G., et al., 2016. Neurobehavioral and antioxidant effects of ethanolic extract of yellow propolis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2906953.
- de Mendonça, I.C.G., Porto, I.C.C., de, M., do Nascimento, T.G., de Souza, N.S., Oliveira, J.M., dos, S., Arruda, R.E., dos, S., Mousinho, K.C., dos Santos, A.F., Basílio-Júnior, I. D., Parolia, A., et al., 2015. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 357.
- de Weger, V.A., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M.1, 2014. Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel—a review. *Anticancer Drugs* 25, 488–494.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S., 1992. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine* 10, 817–823.
- Dota, K.F.D., Consolaro, M.E.L., Svidzinski, T.I.E., Bruschi, M.L., 2011. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 201953.
- Duran, N., Muz, M., Culha, G., Duran, G., Ozer, B., 2011. GC–MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol. Res.* 108, 95–105.
- Falcão, S.I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L.M., Barros, C., Domingues, M.R.M., Cardoso, S. M., 2010. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 887–897.
- Fontanilla, C.V., Ma, Z., Wei, X., Klotsche, J., Zhao, L., Wisniowski, P., Dodel, R.C., Farlow, M.R., Oertel, W.H., Du, Y., 2011. Caffeic acid phenethyl ester prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 188, 135–141.
- Fontanilla, C.V., Wei, X., Zhao, L., Johnstone, B., Pascuzzi, R.M., Farlow, M.R., Du, Y., 2012. Caffeic acid phenethyl ester extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 205, 185–193.
- Frozza, C.O., Garcia, C.S., Gambato, G., de Souza, M.D., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S., et al., 2013. Chemical characterization: antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 52, 137–142.
- Havsteen, B.I., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1141–1148.
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G.-Q., Hu, F.-L., 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Mol. Basel Switz.* 19, 19610–19632.
- Iio, A., Ohguchi, K., Maruyama, H., Tazawa, S., Araki, Y., Ichihara, K., Nozawa, Y., Ito, M., 2012. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharm.* 19, 383–388.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J., 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* 58, 71–96.
- Khacha-ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., Tragoolpua, Y., 2013. Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 14, 6991–6995.
- Kobayashi, T., Nakata, T., Kuzumaki, T., 2002. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 176, 17–23.
- Komoda, Y., 1989. Isolation of flavonoids from *Populus nigra* as delta 4-3-ketosteroid (5 alpha) reductase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37, 3128–3130.
- Kubina, R., Kabala-Dzik, A., Dziejdz, A., Bielec, B., Wojtyczka, R.D., Bućdak, R.J., Wysznińska, M., Stawiarska-Pięta, B., Szaflarska-Stojko, E., 2015. The ethanol extract of polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and me45 malignant melanoma cells in vitro conditions. *Adv. Clin. Exp. Med.* 24, 203–212.
- Kunimasa, K., Ahn, M.-R., Kobayashi, T., Eguchi, R., Kumazawa, S., Fujimori, Y., Nakano, T., Nakayama, T., Kaji, K., Ohta, T., 2011. Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 870753.
- Lee, M.-S., Kim, Y.H., Park, W.-S., Ahn, W.G., Park, O.K., Kwon, S.-H., Morita, K., Shim, I., Her, S., 2013. Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 217853.
- Li, H., Kapur, A., Yang, J.X., Srivastava, S., McLeod, D.G., Paredes-Guzman, J.F., Dausgch, A., Park, Y.K., Rhim, J.S., 2007. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int. J. Oncol.* 31, 601–606.
- Li, Y.-J., Xuan, H.-Z., Shou, Q.-Y., Zhan, Z.-G., Lu, X., Hu, F.-L., 2012. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 31, 157–165.
- Lin, H.-P., Jiang, S.S., Chuu, C.-P., 2012. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. *PLoS One* 7, e31286.
- Liu, R., Li, J., Song, J., Zhou, D., Huang, C., Bai, X., Xie, T., Zhang, X., Li, Y., Wu, C., et al., 2014. Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiol. Aging* 35, 1275–1285.
- Lopes, A.A., Ferreira, T.S., Nesi, R.T., Lanzetti, M., Pires, K.M.P., Silva, A.M., Borges, R. M., Silva, A.J.R., Valença, S.S., Porto, L.C.1, 2013. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 7570–7577.
- Machado, B.A.S., Silva, R.P.D., de A, Barreto G., Costa, S.S., Silva, D.F., da Brandão, H.N., Rocha, J.L.C., da Dellagostin, O.A., Henriques, J.A.P., Umsza-Guez, M.A., et al., 2016. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One* 11, e0145954.
- McEleny, K., Coffey, R., Morrissey, C., Fitzpatrick, J.M., Watson, R.W.G., 2004. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int.* 94, 402–406.
- Miguel, M.G., Nunes, S., Dandlen, S.A., Cavaco, A.M., Antunes, M.D., 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve: south of Portugal. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 3418–3423.
- Muli, E.M., Maingi, J.M., 2007. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 655–663.
- Nair, H.K., Rao, K.V.K., Aalinkeel, R., Mahajan, S., Chawda, R., Schwartz, S.A.1, 2004. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 63–69.
- Nam, J.-S., Sharma, A.R., Nguyen, L.T., Chakraborty, C., Sharma, G., Lee, S.-S., 2016. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. *Mol. Basel Switz.* 21, E108.
- Ni, J., Wu, Z., Meng, J., Zhu, A., Zhong, X., Wu, S., Nakanishi, H., 2017. The neuroprotective effects of Brazilian green propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 7984327.
- Oliveira, A.C.P., Shinobu, C.S., Longhini, R., Franco, S.L., Svidzinski, T.I.E., 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 493–497.
- Orsatti, C.L., Missisa, F., Pagliarone, A.C., Bachiega, T.F., Búfalo, M.C., Araújo, J.P., Sforcin, J.M., 2010. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother. Res. PTR* 24, 1141–1146.
- Orsolić, N., Knezević, A.H., Sver, L., Terzić, S., Basić, I., 2004. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.* 94, 307–315.
- Papachroni, D., Graikou, K., Kosalec, I., Damianakos, H., Ingram, V., Chinou, I.1, 2015. Phytochemical analysis and biological evaluation of selected African propolis samples from Cameroon and Congo. *Nat. Prod. Commun.* 10, 67–70.
- Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2502–2506.
- Patel, S., 2016. Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents. *J. Diet. Suppl.* 13, 245–268.
- Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, I., Naydenski, H., Muli, E., Bankova, V., 2010. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia* 81, 509–514.
- Piccinelli, A.L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rastrelli, L., 2011. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6484–6491.
- Piccinelli, A.L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R.P., Rastrelli, L., 2013. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5080–5088.
- Pommier, A.J.C., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., et al., 2010. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29, 2712–2723.
- Pommier, A.J.C., Dufour, J., Alves, G., Viennois, E., De Boussac, H., Trousson, A., Volle, D.H., Caira, F., Val, P., Arnaud, P., et al., 2013. Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* 9, e1003483.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcuzzan, G.L., Bogdanov, S., 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.* 15, 235–240.
- Popova, M.P., Chinou, I.B., Marekov, I.N., Bankova, V.S.1, 2009. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* 70, 1262–1271.
- Popova, M.P., Graikou, K., Chinou, I., Bankova, V.S., 2010. GC–MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3167–3176.
- Popova, M.P., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., Tsvetkova, I., Najdenski, H., Bankova, V., 2011. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem.* 1431–1435.
- Popova, M., Dimitrova, R., Al-Lawati, H.T., Tsvetkova, I., Najdenski, H., Bankova, V., 2013. Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chem. Cent. J.* 7, 158.
- Quiroga, E.N., Sampietro, D.A., Soberón, J.R., Sgariglia, M.A., Vattuone, M.A., 2006. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J. Appl. Microbiol.* 101, 103–110.
- Rahman, M.M., Richardson, A., Sofian-Azirun, M., 2010. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 1872–1878.

- Reis, J.S.S., Oliveira, G.B., Monteiro, M.C., Machado, C.S., Torres, Y.R., Prediger, R.D., Maia, C.S.F., 2014. Antidepressant- and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharm.* 21, 1466–1472.
- Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2363–2370.
- Rizk, S.M., Zaki, H.F., Mina, M.A.M., 2014. Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 67, 176–186.
- Rosenberg Zand, R.S., Jenkins, D.J.A., Diamandis, E.P., 2002. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 777, 219–232.
- Rushdi, A.I., Adgaba, N., Bayaqoob, N.I.M., Al-Khazim, A., Simoneit, B.I.T., El-Mubarak, A.H., Al-Mutlaq, K.F., 2014. Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *SpringerPlus* 3, 253.
- Ryu, S., Lim, W., Bazer, F.W., Song, G., 2017. Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress. *J. Cell. Physiol.* doi:http://dx.doi.org/10.1002/jcp.25861 Feb 18. [Epub ahead of print].
- Salim, E.I., Abd El-Magid, A.D., Farara, K.M., Maria, D.S.M., 2015. Antitumoral and antioxidant potential of egyptian propolis against the PC3 prostate cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 7641–7651.
- Samarghandian, S., Afshari, J.T., Davoodi, S., 2011. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. *Clin. Sao Paulo Braz.* 66, 1073–1079.
- Sampietro, D.A., Sampietro Vattuone, M.M., Vattuone, M.A., 2016. Immunomodulatory activity of *Apis mellifera* propolis from the North of Argentina. *LWT – Food Sci. Technol.* 9–15.
- Sanderson, J.T., Hordijk, J., Denison, M.S., Springsteel, M.F., Nantz, M.H., van den Berg, M., 2004. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Sci.* 82, 70–79.
- Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B., Marcucci, M., de Oliveira Rodrigues, R.F., Eberlin, M.N., 2006. Brazilian propolis of tetragonisca angustula and apis mellifera. *Apidologie* 398–407.
- Segueni, N., Magid, A.A., Decarme, M., Rhouati, S., Lahouel, M., Antonicelli, F., Lavaud, C., Hornebeck, W., 2011. Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from Algeria. *Planta Med.* 77, 999–1004.
- Sforcin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113, 1–14.
- Sforcin, J.M., 2016. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother. Res. PTR* 30, 894–905.
- Shen, K.-H., Hung, S.-H., Yin, L.-T., Huang, C.-S., Chao, C.-H., Liu, C.-L., Shih, Y.-W., 2010. Acacetin a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 279–291.
- Silici, S., Ünlü, M., Vardar-Ünlü, G., 2007. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1797–1803.
- Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis: a new type of brazilian propolis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 5, 313–316.
- Silva-Carvalho, R., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A.M., Cardoso, S.M., Sobral, A.J.F.N., Almeida-Aguiar, C., Baltazar, F., 2014. Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. *J. Funct Foods* 160–171.
- Soda, M., Hu, D., Endo, S., Takemura, M., Li, J., Wada, R., Ifuku, S., Zhao, H.-T., El-Kabbani, O., Ohta, S., et al., 2012. Design: synthesis and evaluation of caffeic acid phenethyl ester-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human aldo-keto reductase 1B10. *Eur. J. Med. Chem.* 48, 321–329.
- Sun, L.-P., Chen, A.-L., Hung, H.-C., Chien, Y.-H., Huang, J.-S., Huang, C.-Y., Chen, Y.-W., Chen, C.-N., 2012. Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11748–11758.
- Szliszka, E., Czuba, Z.P., Bronikowska, J., Mertas, A., Paradysz, A., Krol, W., 2011a. Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 535172.
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., Krol, W., 2011b. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Oncol.* 38, 941–953.
- Trivedi, R., Mishra, D.P., 2015. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells. *Front. Oncol.* 5.
- Tseng, J.-C., Lin, C.-Y., Su, L.-C., Fu, H.-H., Yang, S.-D., Chuu, C.-P., 2016. CAPE suppresses migration and invasion of prostate cancer cells via activation of non-canonical Wnt signaling. *Oncotarget* 7, 38010–38024.
- Turan, I., Demir, S., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., Deger, O., 2015. Cytotoxic effect of turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. *Trop. J. Pharm. Res.* 777–782.
- Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M., 2011. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 49, 86–92.
- Wagh, V.D., 2013. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013, 308249.
- Wang, Y., Miao, Y., Mir, A.Z., Cheng, L., Wang, L., Zhao, L., Cui, Q., Zhao, W., Wang, H., 2016. Inhibition of beta-amyloid-induced neurotoxicity by pinocembrin through Nrf2/HO-1 pathway in SH-SY5Y cells. *J. Neurol. Sci.* 368, 223–230.
- Watanabe, M.A.E., Amarante, M.K., Conti, B.J., Sforcin, J.M., 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1378–1386.
- Zhang, E.-H., Wang, R.-F., Guo, S.-Z., Liu, B., 2013a. An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 815621.
- Zhang, W., Lan, Y., Huang, Q., Hua, Z., 2013b. Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK. *Cytotechnology* 65, 447–455.
- Zhang, W., Tang, B., Huang, Q., Hua, Z., 2013c. Galangin inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma. *J. Cell. Biochem.* 114, 152–161.

Annexe 2

ORIGINAL ARTICLE

Oxidative stress in benign prostate hyperplasiaN. Zabaiou¹, D. Mabed², J. M. Lobaccaro³ & M. Lahouel¹¹ Laboratory of Molecular Toxicology, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University of Jijel, Jijel, Algeria;² Urology Service, Mohammed Essedik Benyahya Jijel Hospital, Jijel, Algeria;³ UMR CNRS6293-Clermont University-INSERM U1103 Campus Universitaire des Cézeaux, Clermont Ferand, France**Keywords**

Antioxidant enzymes—benign prostate hyperplasia—glutathione—MDA—oxidative stress

Correspondence

Mesbah Lahouel, Laboratory of Molecular Toxicology, Faculty of Sciences, University of Jijel, 18000, Jijel, Algeria.

Tel/Fax: 00 (213) 34 50 26 87;

E-mail: lahouelmesbah@univ-jijel.dz

Accepted: February 23, 2015

doi: 10.1111/and.12420

Summary

To assess the status of oxidative stress in benign prostate hyperplasia, a very common disease in older men which constitutes a public health problem in Jijel, prostate tissues were obtained by transvesical adenectomy from 10 men with benign prostate hyperplasia. We measured the cytosolic levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) and cytosolic enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase. The development of benign prostate hyperplasia is accompanied by impaired oxidative status by increasing levels of MDA, depletion of GSH concentrations and a decrease in the activity of all the antioxidant enzymes studied. These results have allowed us to understand a part of the aetiology of benign prostate hyperplasia related to oxidative stress.

Introduction

Benign prostate hyperplasia (BPH), also called prostate adenoma, is the most common disease in older men and is characterised by an increase in the size of the prostate gland due to an overgrowth of prostate cells. In Jijel, the incidence of this disease continues to grow. Hospital Mohamed Seddik Benyahya annually receives dozens of patients suffering from this disease, and the majority of them require surgery.

The aetiology is unknown so far. The most likely cause is that related to hormonal changes that occur over time. The testes produce testosterone, which is converted to dihydrotestosterone (DHT) and oestradiol. They tend to accumulate with time reaching high levels resulting in the appearance of disturbances of prostate hormonal homeostasis (Kwiatek *et al.*, 2007).

In addition, oxidative stress and increased generation of ROS in various cellular processes would also cause various damages and molecular and cellular disturbances in several human diseases. These disturbances can cause damage to DNA and chromosomes and induce epigenetic alterations or interact with oncogenes or tumour suppressor genes and are currently associated with unbalanced growth and proliferation as well as neoplasia (Savas, 2012).

In the prostate, a high production of ROS has been linked with the development of adenoma and prostate

cancers, where very high levels of ROS, especially H₂O₂ and the superoxide radical, were found (Khandrika *et al.*, 2009). This excessive production of ROS is suggested to be linked to exposure to androgens, which are directly associated with the development of adenoma and prostate cancer (Ripple *et al.*, 1997). These ROS may play an important role in the occurrence, recurrence and progression of prostate cancer (Mehraein-Ghomi *et al.*, 2008). Experimental studies show that prolonged administration of DHT and oestradiol in rats induces the expression of pro-inflammatory cytokines in the prostate (Khandrika *et al.*, 2009). The inflammatory infiltrates were identified as the major source of ROS production. The induction of stress at the prostatic epithelium has been linked to the formation of proliferative inflammatory atrophy (PIA) (Khandrika *et al.*, 2009). This lesion is usually the basis of the increase and the regeneration of epithelial cell proliferation and leads to the development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostate cancer.

Understanding the mechanisms involved in the apparition and progression of benign prostate hyperplasia, in particular those related to oxidative stress, allows a better characterisation and therefore even better prevention and diagnosis of this pathology.

In this context, we evaluated oxidative stress and studied its involvement in adenomatous prostatic tissues of Jijelian patients by measurement of the levels of MDA and glutathione (GSH) and evaluation of the activity of

superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx).

Patients and methods

Prostatic tissues were obtained from 24 males aged between 58 and 85 years by transvesical adenomectomy as surgical treatment of BPH at Hospital Mohamed Seddik Benyahia of Jijel. All these patients showed the same urinary characteristic symptoms including dysuria, pollakiuria, urinary retention and a weak stream.

According to the mass of the benign hyperplasia tumour developed in the prostate estimated by ultrasound, patients were divided into four groups: group 1 (6 mean), tumour 20–40 g; group 2 (6 mean), prostate 41–60 g; group 3 (6 mean), prostate 61–80 g; and group 4 (6 mean), prostate >100 g. The patients of the first group had the lower BPH mass and were recruited as controls.

MDA levels in BPH tissues were measured according to the method by Okhawa *et al.* (1979). Briefly, 1 g of BPH tissue was homogenised with 3 volumes of KCl (1.15 M), and then, 0.5 ml of the homogenate was mixed with 1 ml of thiobarbituric acid (0.67%) and 0.5 ml TCA (20%) and heated for 15 min at 100 °C. The reaction was stopped by cooling. Two millilitres of n-butanol was then added to the mixture and centrifuged. The DO of the supernatant was measured at 530 nm.

BPH-reduced glutathione (GSH) levels were measured as previously described by Ellman (1959). Fifty microlitres of the homogenate was diluted with 10 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 8). Twenty microlitres of DTNB (0.01 M) was added to 3 ml of the dilution mixture and incubated for 15 min. The absorbance was read at 412 nm. GSH levels were expressed as mmol g^{-1} tissue.

SOD activity was assayed on the basis of the technique of Beauchamp & Fridovich (1971). Reaction mixture containing 0.1 ml cyanide sodium (10^{-2} M), 0.1 ml NBT ($1.76 \cdot 10^{-4}$ M), 1 ml EDTA ($66 \cdot 10^{-3}$ M), 0.1 ml riboflavin ($2 \cdot 10^{-6}$ M) and 0.7 ml phosphate buffer was mixed with 5 μl of homogenate and 0.1 ml of methionine (10^{-2} M). After incubation for 10 min, absorbance was read at 560 nm. A single unit of enzyme was expressed as 50% inhibition of NBT (nitroblue tetrazolium).

CAT was assayed by the method of Claiborne (1985). The reaction takes place in a spectrophotometer cuvette at 25 °C by placing 1 ml of phosphate buffer (0.1 M; pH 7.2), 0.950 ml of hydrogen peroxide (0.019 M) and 0.025 ml of the cytosolic fraction. The decrease in absorbance was measured every minute for 2 min at 240 nm against blank containing all components except the homogenate. The activity is expressed in IU g^{-1} protein.

GST activity in BPH tissues was estimated as described previously by Habig *et al.* (1974). The reaction mixture

contains 1700 μl of phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) and 100 μl of CDNB (20 mM). After incubation at 37 °C, the reaction is started by adding 100 μl of the cytosolic fraction and 100 μl of glutathione. The variation of the optical density is read every minute for 5 min at 340 nm.

GPx activity was determined by the method of Paglia & Valentine (1967). In brief, to 2 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7) were added 50 μl of the glutathione, 100 μl of glutathione reductase (30 U ml^{-1}), 50 μl of NaN_3 , 100 μl Na_2EDTA , 100 μl of NADPH and 50 μl of the cytosolic fraction. The volume is completed to 2.9 ml. Hundred microlitres of H_2O_2 (30%) was then added, and the decrease in the absorbance is followed every minute for 3 min at 340 nm. The activity is expressed in $\mu\text{mole min g}^{-1}$ protein.

Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin (BSA) as standard at 660 nm.

Student's *t*-test was used to measure differences of all evaluated parameters between the 4 groups of patients. All data are expressed as the mean \pm s.d (standard deviation), and the values are considered statistically significant at *P* value <0.05.

Results

To study the implication of oxidative stress in the development of BPH, we examined a number of markers and principle enzymes which play a principle role in oxidative stress mechanism.

The levels of MDA and GSH and values of the activities of SOD, CAT, GST and GPx in prostatic adenomas are presented in Table 1 and Figs 1, 2 and 3.

Figure 1 shows an increase in MDA levels in all groups of prostatic adenomas. This increase was significant ($P < 0.05$) in group 2 and highly significant ($P < 0.001$) in groups 3 and 4 reflecting the presence of a high lipid peroxidation in these tissues.

The determination of glutathione (Fig. 2) showed that this factor is also related to the development of benign prostatic hyperplasia, as this value decreases with the growth of adenomatous mass (group 4, $P < 0.01$). The enzyme activities of various antioxidant enzymes studied are also deteriorated (Fig. 3). We recorded a significant decrease ($P < 0.05$) in the enzymatic activity of SOD and catalase in groups 3 and 4. The development of benign prostatic hyperplasia is also accompanied with a decrease in cellular GST activity. The decrease was highly significant ($P < 0.001$) in groups 3 and 4 and very significant ($P < 0.01$) in the second group. The GPx activity was assessed in only two groups (first and fourth). And as for other enzymes, a significant decrease ($P < 0.05$) of this activity was recorded in group 4.

Table 1 Variations of MDA and GSH rates and enzymatic activities of SOD, CAT, GST and GPx in BPH groups

Parameters	Group 1 control (n = 6)	Group 2 (n = 6)	Group 3 (n = 6)	Group 4 (n = 6)
MDA (nmole mg ⁻¹)	4.385 ± 0.247	6.210 ± 0.701 ^a	7.723 ± 0.253 ^c	8.280 ± 0.375 ^c
GSH	1.775 ± 0.176	1.1833 ± 0.202 ^a	0.4566 ± 0.060 ^a	0.4 ± 0.012 ^b
SOD (IU g ⁻¹ P)	489.70 ± 53.273	404.64 ± 37.991 ^{ns}	350.38 ± 41.585 ^a	86.10 ± 28.056 ^a
CAT (IU g ⁻¹ P)	188.65 ± 0.828	135.8 ± 0.226 ^{ns}	038.5 ± 0.020 ^a	036.0 ± 0.029 ^a
GST (IU g ⁻¹ P)	026.85 ± 0.0021	014.0 ± 0.025 ^b	009.85 ± 0.0035 ^c	009.3 ± 0.007 ^c
GPx (IU g ⁻¹ P)	004.5 ± 0.0007	ND	ND	001.59 ± 0.0092

The results are expressed as mean ± s.d Student's *t*-test: ^{ns}nonsignificant effect ($P > 0.05$), ^adenotes a significant effect ($P < 0.05$), ^bindicates a very significant effect ($P < 0.01$), and ^cindicates a highly significant effect ($P < 0.001$).

SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GST, glutathione S-transferase; GPx, glutathione peroxidase.
g P: g of protein. ND: not determined.

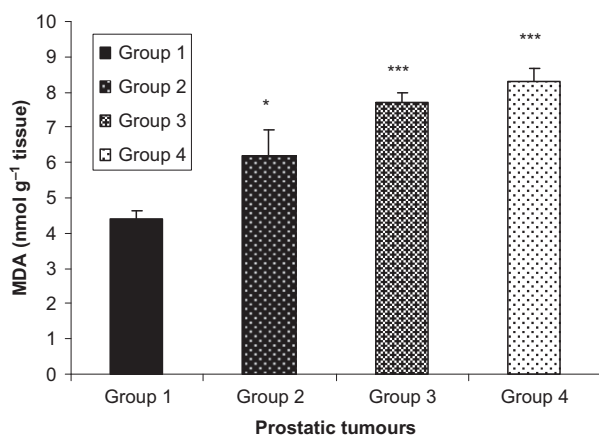


Fig. 1 Changes in MDA values in BPH groups. * P value < 0.05 ; *** P value < 0.001 .

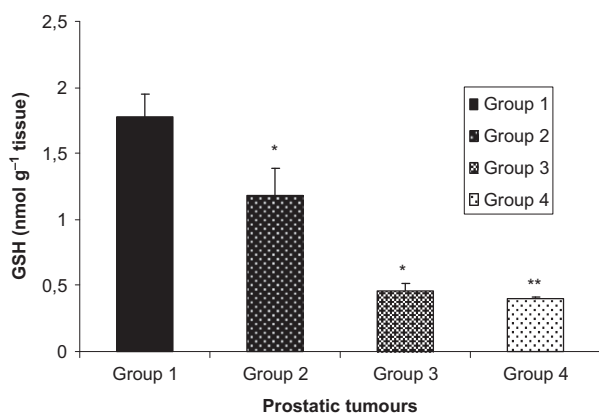


Fig. 2 Changes in the levels of GSH in BPH groups. * P value < 0.05 . ** P value < 0.01 .

Discussion

Excessive production of free radicals causes direct damage to biological molecules (DNA, proteins, lipids and carbohydrates oxidation) but also secondary lesions due to

cytotoxic and mutagenic characters of metabolites released especially during lipid oxidation (Favier, 2003). The latter called lipid peroxidation provides a wide range of products which include aldehydes and more specifically MDA. MDA, by its high cytotoxicity and inhibitory action on antioxidant enzymes, acts as a cancer promoter and cocarcinogenic agent (Samir & el Kholy, 1999).

The results of our study show increased levels of MDA in cytosolic adenomatous prostate tissues. Proceeding for the determination of MDA in serum of patients with prostatic adenomas and in those patients with prostate cancer, Almushatat *et al.* (2006) also recorded increased levels of MDA in these tissues.

SOD and catalase are the major enzymes involved in the antioxidant defence mechanism as they are involved in the direct elimination of ROS. SOD plays a role in dismutation of the superoxide radical O_2^- by converting to H_2O_2 and thus leads to the reduction of toxic effects due to this radical and other radicals derived from secondary reactions (Pasupathi *et al.*, 2009). In adenomatous tissues that we studied, we found that the enzymatic activity of cytosolic SOD decreased dramatically in big adenomas. This difference in SOD activity is due to the fact that when the levels of superoxide anion present in these cells are moderate, the body responds by overexpressing SOD (Pincemail *et al.*, 2002), and when the stress persists and produces a massive ROS, which is probably the case in these tissues adenomatous, SOD will be destroyed. According to Jung *et al.* (1997), the reduction of the enzymatic activity of SOD and catalase in benign prostatic hyperplasia is correlated with the increase in the amount of modified DNA bases.

We also recorded a decrease in the activity of catalase in cytosolic adenomatous and neoplastic tissues. This decrease may result from the fact that in these tissues studied, there is not enough hydrogen peroxide converted by SOD because of the inhibition in the activity of the latter, which did not require the use of large concentrations of catalase to eliminate them. However, H_2O_2 is not

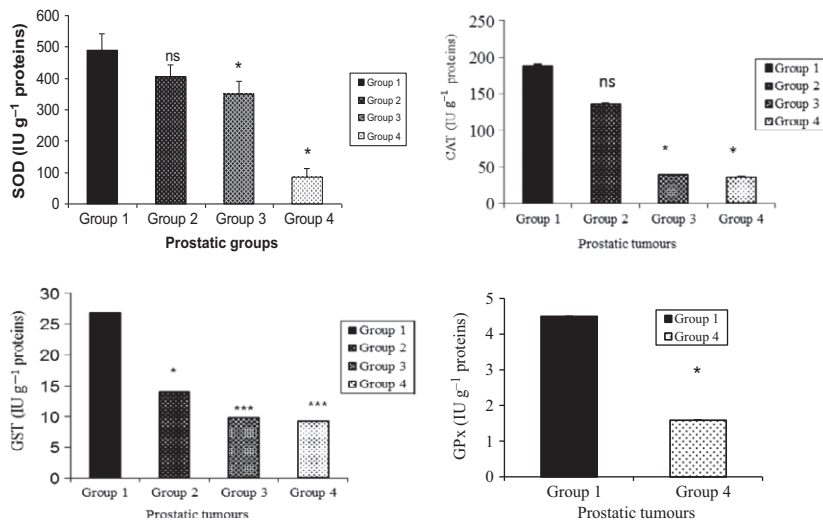


Fig. 3 Changes in antioxidant enzymes' activities of SOD, CAT, GST and GPx in BPH groups. **P* value <0.05; ****P* value <0.001.

only formed from the dismutation of superoxide anion because it can also be produced by different oxidases including amino oxidase and urate oxidase (Gardès-Albert *et al.*, 2003). This suggests the existence of an inhibition of the activity of the cytosolic catalase. Indeed, a study already made by Lukaszewicz-Hussain (2001) showed that the activity of this enzyme can be inhibited in the presence of superoxide anion. Generally, lower levels of catalase may lead to accumulation of H₂O₂ and other toxic species in the tissues, which can in turn lead to an increase in DNA damages. However, the decrease in catalase activity can especially damage the prostate gland, because prostate tissues are rich in polyamines whose oxidation by amine oxidase generates H₂O₂ among other products released (Olinski *et al.*, 1995).

Measuring the cytosolic GPx activity in the prostatic adenomas showed that this activity decreases with the development of adenomatous prostatic tumour. As catalase, two options are possible to explain the behaviour of this activity. The first is that low concentrations of GPx are probably due to the presence of low concentrations of H₂O₂ (which have not been converted by SOD). The second is the presence of an inhibition of cytosolic GPx activity. Indeed, during oxidative stress, deficiencies in certain nonenzymatic antioxidants such as vitamin E, vitamin C, carotenoids and some trace elements such as selenium have been observed (Bonfont-Rousselot, 2007). The latter deficiency is most often accompanied by a decrease in GPx activity (Ducros *et al.*, 2000).

The results of the assessment of GST activity were similar to those obtained with other antioxidant enzymes studied (SOD, catalase and GPx): a decrease in the enzymatic activity of GST that evolves with the evolution of the prostatic adenoma. The GST activity is closely related to glutathione, as it catalyses the reaction of neutralisation

and elimination of xenobiotics and toxic free radicals using GSH as a cofactor. Depletion in the latter can partly explain the decrease in GST activity.

Cytosolic GSH levels recorded in different groups of prostatic adenomas were also reduced. Relatively low concentrations are recorded in larger adenomas. This depletion of cytosolic GSH levels may be due to the presence of an inhibition of GSH in adenomatous cells. In fact, the antioxidant activity of GSH is dependent on two enzymes: GPx and GR (glutathione reductase) (Lukaszewicz-Hussain & Moniuszko-Jakoniuk, 2004). GR catalyses the reduction of oxidised glutathione (GSSG) on reduced glutathione (GSH). It is involved in the maintenance of glutathione in reduced form. The decrease in GSH is therefore probably due to an inhibition of GR activity that does not regenerate glutathione leading to its accumulation in its oxidised form GSSG. The inhibition can also be the result of inhibition of the gene coding for the enzymes involved in the synthesis of glutathione, mainly glutathione synthetase due to mutations or to a deactivation of the transcription. It may also be due to deficiencies in one or more amino acids involved in its synthesis. Indeed, under conditions of oxidative stress, ROS and RNS attack amino acids and lead to the formation of new products. Under these conditions, glutamate is converted to 4-hydroxy-glutamate, and cysteine is Cys-SS-Cys or Cys-SSR disulphide (Valko *et al.*, 2006).

Conclusion

This study showed that the pathophysiology of benign prostate hyperplasia is accompanied by impaired oxidative status throughout elevated levels of MDA, GSH depletion and decreased enzymatic activities of SOD, CAT, GPx and GST.

These alterations in oxidative status especially by the inhibition of the antioxidant activity make the cells susceptible to attack by free radicals and lipid peroxidation products involved in the modulation of gene expression associated with promoting of tumorigenesis. The results are also a very important step in understanding the aetiology of this disease, and the study of biological alterations and modifications is an important tool for the development of new therapeutic approaches.

References

- Almushatat ASK, Talwar D, McArdle PA, Williamson C, Sattar N, O'Reilly D, St J, Underwood MA, McMillan DC (2006) Vitamin antioxidants, lipid peroxidation and the systemic inflammatory response in patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 118:1051–1053.
- Beauchamp CO, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287.
- Bonnefont-Rousselot D (2007) Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biol* 157:23–26.
- Claiborne A (1985) Catalase activity. In: CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Greenwald RA (ed.). CRC Press, Boca Raton, pp 283–284.
- Ducros V, Ferry M, Faure P, Belin N, Renversez JC, Ruffieux D, Favier A (2000) Distribution of selenium in plasma of French women: relation to age and selenium status. *Clin Chem* 46:731–733.
- Ellman G (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 32:70–77.
- Favier A (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 11–12:108–115.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. (2003) Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique* 11–12:91–96.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139.
- Jung K, Seidel B, Rudolph B, Lein M, Cronauer MV, Henke W, Hampel G, Schnorr D, Loening SA (1997) Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. *Free Radic Biol Med* 23:127–133.
- Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK (2009) Role of oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett* 282:125–136.
- Kwiatk WM, Banaś A, Banaś K, Cinque G, Dyduch G, Falkenberg G, Kisiel A, Marcelli A, Podgórczyk M (2007) Micro and bulk analysis of prostate tissues classified as hyperplasia. *Spectrochim Acta, Part B* 62:707–710.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Lukaszewicz-Hussain A (2001) Organophosphate insecticide chlorfenvinphos affects superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde in rat liver. *Polish J Environ Stud* 10:279–282.
- Łukaszewicz-Hussain A, Moniuszko-Jakoniuk J (2004) Chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects liver mitochondria antioxidative enzymes, glutathione and hydrogen peroxide concentration. *Polish J Environ Stud* 13:397–401.
- Mehraein-Ghomi F, Lee E, Church DR, Thompson TA, Basu HS, Wilding G (2008) JunD mediates androgen-induced oxidative stress in androgen dependent LNCaP human prostate cancer cells. *Prostate* 68:924–934.
- Okhawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem* 95:351–358.
- Oliniski R, Zastawny TH, Foksinski M, Barecki A, Dizdaroglu M (1995) DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. *Free Radic Biol Med* 18:807–813.
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158–169.
- Pasupathi P, Saravanan G, Farook J (2009) Oxidative stress bio markers and antioxidant status in cigarette smokers compared to nonsmokers. *J Pharm Sci Res* 1:55–62.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nut Clin Met* 16:233–239.
- Ripple MO, Henry WF, Rago RP, Wilding G (1997) Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89:40–48.
- Samir M, el Kholy NM (1999) Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol* 24:232–234.
- Savas M (2012). Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. In: Studies on Men's Health and Fertility. Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG (eds). Humana Press, New York, pp 672.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1–40.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abate-Shen C. and Shen MM. (2002). Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet.*; 18(5): S1–S5.
- Abate-Shen C. and Shen MM. (2010). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.*; 14:2410–2434.
- Abdelrahim M., Smith R. and Safe S. (2003). Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. *Mol Pharmacol.*; 63: 1373–1381.
- Abrahamsson PA. (1996). Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl.*; 6: 3–8.
- Agoulnik IU. and Weigel NL. (2006). Androgen receptor action in hormonedependent and recurrent prostate cancer. *J Cell Biochem.* ; 99: 362–372.
- Alencar SM., Oldoni TLC., Castro ML., Cabral ISR., Costa-Neto CM., Cury JA., Rosalen PL. and Ikegaki M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol.*; 113: 278–283.
- Allen RT., Cluck MW. and Agrawal DK. (1998). Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci.*; 54: 427–445.
- Amakura Y., Tsutsumi T., Nakamura M., Handa H., Yoshimura M., Matsuda R. and Yoshida T. (2010). Tectochrysin in propolis is a potent natural aryl hydrocarbon receptor ligand. *Planta Med.*; 76: pp676.
- Amakura Y., Tsutsumi T., Sasaki K., Nakamura M., Yoshida T. and Maitani T. (2008). Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by in vitro bioassay. *Phytochemistry*; 69(18): 3117–3130.
- Amini-Sarteshnizi N., Mobini-Dehkordi M., Khosravi-Farsani S. and Teimori H. (2015). Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line. *J HerbMed Pharmacol.*; 4(1): 29–34.
- Andriole GL., Crawford ED., Grubb RL., Buys SS., Chia D., Church TR., Fouad MN., Gelmann EP., Kvale PA., Reding DJ., Weissfeld JL., Yokochi LA., O'Brien B., Clapp JD., Rathmell JM., Riley TL., Hayes RB., Kramer BS., Izmirlian G., Miller AB., Pinsky PF., Prorok PC., Gohagan JK. and Berg CD. (2009). Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med.*; 360: 1310–1319.
- Anttila S., Hakkola J., Tuominen P., Elovaara E., Husgafvel-Pursiainen K., Karjalainen A., Hirvonen A. and Nurminen T. (2003). Methylation of cytochrome P4501A1 promoter in the lung is associated with tobacco smoking. *Cancer Res.*; 63: 8623–8628.
- Arafa HM., Aly HA., Abd-Ellah MF. and El-Refaey HM. (2009). Hesperidin attenuates benzo[α]pyrene-induced testicular toxicity in rats via regulation of oxidant/antioxidant balance. *Toxicol Ind Health.*; 25(6): 417–427.
- Arey J. and Atkinson R. (2003). Photochemical reactions of PAH in the atmosphere P.E.T. Douben (Ed.)In: PAHs: an ecotoxicological perspective. *John Wiley and Sons Ltd, New York*: 47–63.

- Armstrong BG., Hutchinson E., Unwin J. and Fletcher T. (2004). Lung Cancer Risk after Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect.*; 112 (9): 970–978.
- Arsova-Sarafinovska Z., Eken A., Matevska N., Erdem O., Sayal A., Savaser A., Banev S., Petrovski D., Dzikova S., Georgiev V., Sikole A., Ozgök Y., Suturkova L., Dimovski AJ. and Aydin A. (2009). Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clin Biochem.*; 42: 1228–1235.
- Aso K., Kanno S., Tadano T., Satoh S. and Ishikawa M. (2004). Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biol Pharm Bull.*; 27(5): 727-730.
- ATSDR. (1995). Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Atlanta (USA)*: pp458.
- Awale S., Li F., Onozuka H., Esumi H., Tezuka Y. and Kadota S. (2008). Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem.*; 16: 181–189.
- Banasiewicz M., Nelson G., Swank A., Grubor N., Ross J., Nesnow S., Köfeler H., Small GJ. and Jankowiak R. (2004). Identification and quantitation of benzo[a]pyrenederived DNA adducts formed at low adduction level in mice lung tissue. *Anal Biochem.*; 334 (2): 390–400.
- Bankova V. (2005a). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.*; 100: 114–117.
- Bankova V. (2005b). Recent trends and important developments in propolis research. *Evid.-Based Complement. Altern Med ECAM.*; 2: 29–32.
- Bankova VS., de Castro SL., and Marcucci Maria C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*: 3–15.
- Barlaam B., Cosulich S., Degorce S., Fitzek M., Green S., Hancox U., Lambert-van der Brempt C., Lohmann JJ., Maudet M., Morgentin R., Pasquet MJ., Péru A., Plé P., Saleh T., Vautier M., Walker M., Ward L. and Warin N. (2015). Discovery of (R)-8-(1-(3,5-difluorophenylamino)ethyl)-N,N-dimethyl-2-morpholino-4-oxo-4H-chromene-6-carboxamide (AZD8186): a potent and selective inhibitor of PI3K β and PI3K δ for the treatment of PTEN-deficient cancers. *J Med Chem.*; 58: 943–962.
- Barlak Y., Değer O., Colak M., Karatayl SC., Bozday AM. and Yücesan F. (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Sci.*; 9: 74.
- Baron S., Manin M., Beaudoin C., Leotoing L., Communal Y., Veyssiere G. and Morel L. (2004). Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem.*; 279(15): 14579–14586.
- Barouki R., Coumoul X. and Fernandez-Salguero PM. (2007). The arylhydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.*; 581(19): 3608–3615.
- Basset V., Flamandb V., Crouzetc S. and Ploussard G. (2013). Choix des nouveaux traitements médicaux dans le cancer de la prostate résistant à la castration : marqueurs prédictifs et évaluation de l'efficacité. *Prog Urol.*; 23(1): 44–48.
- Bastide C., Bagnis C., Mannoni P., Hassoun J. and Bladou F. (2002). A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*; 5: 311–315.

- Beauchamp CO. and Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.*; 44: 276–287.
- Benedettini E., Nguyen P. and Loda M. (2008). The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations. *Diagn Histopathol (Oxf.)*; 14(5): 195-201.
- Benguedouar L., Lahouel M., Gangloff SC., Durlach A., Grange F., Bernard P. and Antonicelli F. (2016). Ethanolic Extract of Algerian Propolis and Galangin Decreased Murine Melanoma T. *Anticancer Agents Med Chem.*; 16(9): 1172–1183.
- Berchem GJ., Bosseler M., Sugars LY., Voeller HJ., Zeitlin S. and Gellmann EP. (1995). Androgens induce resistance to Bcl-2-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.*; 55: 735–738.
- Berney D.M., Gopalan A., Kudahetti S., Fisher G., Ambroisine L., Foster C.S., Reuter V., Eastham J., Moller H., Kattan M.W., Gerald W., Cooper C., Scardino P., and Cuzick J. (2009). Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *Br J Cancer.*; 100(6): 888–893.
- Berquin IM., Min Y., Wu R., Wu H. and Chen YQ. (2005). Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem.*; 280(43):36442–36451.
- Berthold DR., Pond GR., Soban F., de Wit R., Eisenberger M. and Tannock IF. (2008). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol.*; 26: 242–245.
- Birben E., Sahiner UM., Sackesen C., Erzurum S. and Kalayci O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.*; 5(1): 9-19.
- Boam T. (2015). Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *Ecancermedicalscience*; 9: 585.
- Bonne C. and Raynaud JP. (1975). Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R 1881). *Steroids*; 27(4): 497–507.
- Bosch JL., Tilling K., Bohnen AM., Bangma CH. and Donovan JL. (2007). Establishing normal reference ranges for prostate volume change with age in the population-based Krimpen-study: Prediction of future prostate volume in individual men. *Prostate*; 67:1816–1824.
- Bosland MC., Prinsen MK., Dirksen TJ. and Spit BJ. (1990). Characterization of adenocarcinomas of the dorsolateral prostate induced in Wistar rats by N-methyl-N-nitrosourea, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, following sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. *Cancer Res.*; 50(3): 700–709.
- Bostrom PJ., Bjartell AS., Catto JW., Eggener SE., Lilja H., Loeb S., Schalken J., Schlomm T. and Cooperberg MR. (2015). Genomic predictors of outcome in prostate cancer. *Eur Urol.*; 68: 1033–1044.
- Bottaro DP., Rubin JS., Faletto DL., Chan AM., Kmiecik TE., Vande Woude GF. and Aaronson SA. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*; 251(4995): 802-804.
- Bouchard M. and Viau C. (1997). Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration. *Can J Physiol Pharmacol.*; 75: 185–192.

- Boutabet K., Kebsa W., Alyane M. and Lahouel M. (2011). Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J Nephrol.*; 21(2): 101–106.
- Boutros PC., Fraser M., Harding NJ., de Borja R., Trudel D., Lalonde E., Meng A., Hennings-Yeomans PH., McPherson A., Sabelnykova VY., Zia A., Fox NS., Livingstone J., Shiah YJ., Wang J., Beck TA., Have CL., Chong T., Sam M., Johns J., Timms L., Buchner N., Wong A., Watson JD., Simmons TT., P'ng C., Zafarana G., Nguyen F., Luo X., Chu KC., Prokopec SD., Sykes J., Dal Pra A., Berlin A., Brown A., Chan-Seng-Yue MA., Yousif F., Denroche RE., Chong LC., Chen GM., Jung E., Fung C., Starmans MH., Chen H., Govind SK., Hawley J., D'Costa A., Pintilie M., Waggott D., Hach F., Lambin P., Muthuswamy LB., Cooper C., Eeles R., Neal D., Tetu B., Sahinalp C., Stein LD., Fleshner N., Shah SP., Collins CC., Hudson TJ., McPherson JD., van der Kwast T. and Bristow RG. (2015). Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet.*; 47: 736–745.
- Brawer MK., Peehl DM., Stamey TA. and Bostwick DG. (1985). Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res.*; 45: 3663–3667.
- Briganti A., Capitanio U., Suardi N., Gallina A., Salonia A., Bianchi M., Tutolo M., Di Girolamo V., Guazzoni G., Rigatti P. and Montorsi F. (2009). Benign Prostatic Hyperplasia and Its Aetiologies. *Eur Urol.*; 8: 865–871.
- Brooke GN. and Bevan CL. (2009). The Role of Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer Progression. *Curr Genomics.*; 9: 18–25.
- Bubendorf L., Kononen J., Koivisto P., Schraml P., Moch H., Gasser TC., Willi N., Mihatsch MJ., Sauter G. and Kallioniemi OP. (1999). Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res.*; 59: 803–806.
- Bui M. and Reiter RE. (1998). Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.*; 17: 391–399.
- Burdock GA. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol. Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.*; 36: 347–363.
- Busby WF Jr., Smith H., Crespi CL. and Penman BW. (1995). Mutagenicity of benzo[a]pyrene and dibenzopyrenes in the Salmonella typhimurium TM677 and the MCL-5 human cell forward mutation assays. *Mutat Res.*; 342(1–2): 9–16.
- Cai C. and Balk SP. (2011). Intratumoral androgen biosynthesis in prostate cancer pathogenesis and response to therapy. *Endocr-Relat Cancer.*; 18: R175–R182.
- Cardone MH., Roy N., Stennicke HR., Salvesen GS., Franke TF., Stanbridge E. and Frisch S. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*; 282: 1318–1321.
- Carroll AG., Voeller HJ., Sugars L. and Gelmann EP. (1993). p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate*; 23: 123–134.
- Carson JP., Kulik G. and Weber MJ. (1999). Antiapoptotic signaling in LNCaP prostate cancer cells: a survival signaling pathway independent of phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt/protein kinase B. *Cancer Res.*; 59: 1449–1453.
- Chad MV., Tien-Min L. and Richard EP. (2009). AHR signaling in prostate growth, morphogenesis, and disease. *Biochem Pharmacol.*; 77(4): 566–576.

- Chakravarti D., Pelling JC., Cavalieri EL. and Rogan EG. (1995). Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc Natl Acad Sci.*; 92(22): 10422–10426.
- Chakravarti D., Venugopal D., Mailander PC. Meza JL., Higginbotham S., Cavalieri EL. and Rogan EG. (2008). The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat Res.*; 649 (1–2): 161–178.
- Chen CD., Welsbie DS., Tran C., Baek SH., Chen R., Vessella R., Rosenfeld MG. and Sawyers CL. 2004. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med.*; 10(1): 33-39.
- Chen J., Xiao L., Rao J. N., Zou T., Liu L., Bellavance E., Gorospe M. and Wang J-Y. (2008). JunD Represses Transcription and Translation of the Tight Junction Protein Zona Occludens-1 Modulating Intestinal Epithelial Barrier Function. *Mol Biol Cell.*; 19: 3701–3712.
- Chen JZ., Gokden N., Greene GF., Green B. and Kadlubar FF. (2003). Simultaneous generation of multiple mitochondrial DNA mutations in human prostate tumors suggests mitochondrial hypermutagenesis. *Carcinogenesis*; 24: 1481–1487.
- Chen L., Stacewicz-Sapuntzakis M., Duncan C., Sharifi R., Ghosh L. and van Breemen R. (2001). Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *J Natl Cancer Inst.*; 93: 1872–1879.
- Chen S., Gulla S., Cai C. and Balk SP. (2012). Androgen receptor serine 81 phosphorylation mediates chromatin binding and transcriptional activation. *J Biol Chem.*; 287: 8571–8583.
- Chen X., An H., Ao L., Sun L., Liu W., Zhou Z., Wang Y. and Cao J. (2011). The combined toxicity of dibutyl phthalate and benzo[a]pyrene on the reproductive system of male Sprague Dawley rats in vivo. *J Hazard Mater.*; 186(1): 835–841.
- Chen Z., Rasul A., Zhao C., Millimouno FM., Tsuji I., Yamamura T., Iqbal R., Malhi M., Li X., Li J. (2013). Antiproliferative and apoptotic effects of pinocembrin in human prostate cancer cells. *Bangladesh J Pharmacol.*; 8(3): 255-262.
- Ching KZ., Ramsey E., Pettigrew N., D'Cunha R., Jason M. and Dodd JG. (1993). Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. *Mol Cell Biochem.*; 126(2):151–158.
- Chipman JK., Hiron PC., Frost GS. and Millburn P. (1981). The biliary excretion and enterohepatic circulation of benzo(a)pyrene and its metabolites in the rat. *Biochem Pharmacol.*; 30: 937–944.
- Chiu SC, Wang MJ, Yang HH, Chen SP, Huang SY, Chen YL., Lin SZ., Harn HJ. and Pang CY. 2011. Activation of NAG-1 via JNK signaling revealed an isochaiulactone-triggered cell death in human LNCaP prostate cancer cells. *BMC Cancer.*; 11; 146.
- Church DR., Lee E., Thompson TA., Basu HS., Ripple MO., Ariazi EA. and Wilding G. (2005). Induction of AP-1 activity by androgen activation of the androgen receptor in LNCaP human prostate carcinoma cells. *The Prostate*; 63: 155–168.
- Chuu C-P., Lin H-P., Ciaccio MF., Kokonti, JM., Hause RJ., Hiipakka RA., Liao S. and Jones RB. (2012). Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prev Res Phila.*; 5: 788–797.
- Claas F.H.J. and van Steenbrugge G.J. (1983). Expression of HLA-like structures on a permanent human tumor line PC-93. *Tissue Antigens*; 21: 227–232.

- Claus R., Kinscherf R., Gehrke C., Bonaterra G., Basnet P., Metz J. and Deigner HP. (2000). Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Drug Res.*; 50: 373–379.
- Coffey K. and Robson CN. (2012). Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J Endocrinol.*; 215 : 221–237.
- Coffey RN., Watson RW. and Fitzpatrick JM. (2001). Signaling for the caspases: their role in prostate cell apoptosis. *J Urol.*; 165: 5–14.
- Cunningham D. and You Z. (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods.*; 2(1): 1–14.
- Czyżewska U., Siemionow K., Zaręba I. and Milyk W. (2016). Proapoptotic Activity of Propolis and Their Components on Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line (CAL-27). *PLoS One*; 11(6): e0157091.
- da Silva SS., Thomé G. da S., Cataneo AHD., Miranda MM., Felipe I., Andrade CGT. de J., Watanabe MAE., Piana GM., Sforcin JM., Pavanelli WR. and Conchon-Costa I. (2013). Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evid-Based Complement Altern Med.*; 2013: 673058.
- da Silveira CCS. de M., Fernandes LMP., Silva ML., Luz DA., Gomes AQ., Monteiro MC., Machado CS., Torres YR., de Lira TO., Ferreira AG., Fontes-Júnior EA. and Maia CSF. (2016). Neurobehavioral and Antioxidant Effects of Ethanolic Extract of Yellow Propolis. *Oxid Med Cell Longev.*; 2016: 2906953.
- Darimont BD., Wagner RL., Apriletti JW., Stallcup MR., Kushner PJ., Baxter JD., Fletterick RJ. and Yamamoto KR. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.*; 12: 3343–3356.
- Darshan MS., Loftus MS., Thadani-Mulero M., Levy BP., Esciun D., Zhou XK., Gjyrezi A., Chanel-Vos C., Shen R., Tagawa ST., Bander NH., Nanus DM. and Giannakakou P. (2011). Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. *Cancer Res.*; 71: 6019–6029.
- Datta SR., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. and Greenberg ME. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*; 91: 231–241.
- De Jong WH., Kroese ED., Vos JG. and Van Loveren H. (1999). Detection of immunotoxicity of benzo[a]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol Sci.*; 50: 214–220.
- de Mendonça ICG., Porto ICC. de M., do Nascimento TG., de Souza NS., Oliveira JM. dos S., Arruda RE. dos S., Mousinho KC., dos Santos AF., Basílio-Júnior ID., Parolia A. and Barreto FS. (2015). Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement Altern Med.*; 15: 357.
- De Nunzio C., Kramer G., Marberger M., Montironi R., Nelson W., Schroder F., Sciarra A. and Tubaro A. (2011). The Controversial Relationship Between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: The Role of Inflammation. *Eur Urol.* ; 60(1): 106–117.
- de Weger VA., Beijnen JH. and Schellens JHM. (2014). Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel--a review. *Anticancer Drugs*; 25: 488–494.

- DeCaprio JA., Ludlow JW., Figge J., Shew JY., Huang CM., Lee WH., Marsilio E., Paucha E. and Livingston DM. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*; 54(2): 275–283.
- Dehm SM. and Tindall DJ. (2006). Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem.*; 99: 333–344.
- Dehm SM. and Tindall DJ. (2007). Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol.*; 21: 2855–2863.
- Delbridge AR.D., Grabow S., Strasser A. and Vaux DL. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer.*; 16: 99–109.
- Devlin HL. and Mudryj M. (2009). Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett.*; 274(2): 177–186.
- DiGiovanni J., Beltran L., Rupp A., Harvey RG. and Gill RD. (1993). Further analysis of c-Ha-ras mutations in papillomas initiated by several polycyclic aromatic hydrocarbons and papillomas from uninitiated, promoter-treated skin in SENCAR mice. *Mol Carcinog.*; 8(4): 272–279.
- Dimov V., Ivanovska N., Bankova V. and Popov S. (1992). Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine*; 10: 817–823.
- Di-Toro DM., McGrath JA. and Hansen DJ. (2000). Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environ Toxicol Chem.*; 19: 1951–1970.
- Djakiew D. (2010). Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate*; 42(2): 150–160.
- Dota KFD., Consolaro MEL., Svidzinski TIE. and Bruschi ML. (2011). Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. Evid.-Based Complement. *Evid Based Complement Alternat Med.*; 2011: 201953.
- Dotzlaw H., Moehren U., Mink S., Cato AC., Iniguez Lluhi JA. and Baniahmad A. (2002). The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol.*; 16: 661–673.
- Drabovich AP., Saraon P., Jarvi K. and Diamandis EP. (2014). Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol.*; 11: 278–288.
- Dutour R. and Poirier D. (2017). Inhibitors of cytochrome P450 (CYP) 1B1. *Eur J Med Chem.*; In Press, Accepted Manuscript .
- Ebert B., Seidel A. and Lampen A. (2005). Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*; 26(10): 1754–1763.
- El-Said El-Mehi A. and Mohamed El- Sherif N. (2015). Modulating Role of Panax Ginseng in Experimentally Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Adult Male Albino Rats. *Austin J Anat.*; 2(1): 1–8.
- Espinosa G., Esposito R., Kazzazi A. and Djavan B. (2013). Vitamin D and benign prostatic hyperplasia-a review. *Can J Urol.*, 20 (4): 6820–6825.

- Flanagan SP. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.*; 8(3): 295–309.
- Förster K., Preuss R., Rossbach B., Brüning T., Angerer J. and Simon P. (2008). 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occup Environ Med.*; 65: 224–229.
- Foster BA., Gingrich JR., Kwon ED., Madias C. and Greenberg NM. (1997). Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.*; 57(16): 3325–3330.
- Foth, H., Kahl R. and Kahl GF. (1988). Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chem Toxicol.*; 26: 45–51.
- Frank SB. and Miranti CK. (2013). Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Front Oncol.*; 3(273): 1–23.
- Freitas M., Alves V., Sarmiento-Ribeiro A. and Mota-Pinto A. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons May Contribute for Prostate Cancer Progression. *J Cancer Ther.*; 4: 37–46.
- Frohlich DA., McCabe MT., Arnold RS. And Day ML. (2008). The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene*; 27: 4353–4362.
- Füllhase C. and Schneider MP. (2016). 5-Alpha-Reductase Inhibitors and Combination Therapy. *Urol Clin North Am.*; 43(3): 325–336.
- Galani P. (2015). Diagnosis & prognosis of prostate cancer. *J Adv Med Dent Scie Res.*; 3(5): S49–S53.
- Gao W., Bohl CE., and Dalton JT. (2005). Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem Rev.*; 105(9): 3352–3370.
- Gasmi J. and Sanderson JT. (2010). Growth inhibitory, antiandrogenic, and pro-apoptotic effects of punicic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *J Agric Food Chem.*; 58(23): 12149-12156.
- Geramoutsos I., Gyftopoulos K., Perimenis P., Thanou V., Liagka D., Siambli D. and Barbalias G., (2004). Clinical correlation of prostatic lithiasis with chronic pelvic pain syndromes in young adults. *Eur Urol.*; 45: 333–338.
- Gluschnaider U., Hidas G., Cojocar G., Yutkin V., Ben-Neriah Y. and Pikarsky E. (2010). Beta-TrCP inhibition reduces prostate cancer cell growth via upregulation of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One.*; 5(2): 1–12.
- Grant P. and Ramasamy S. (2012). An Update on Plant Derived Anti-Androgens. *Int J Endocrinol Metab.*; 10(2): 497–502.
- Gundem G., Van Loo P., Kremeyer B., Alexandrov LB., Tubio JM., Papaemmanuil E., Brewer DS., Kallio HM., Högnäs G., Annala M., Kivinummi K., Goody V., Latimer C., O'Meara S., Dawson KJ., Isaacs W., Emmert-Buck MR., Nykter M., Foster C., Kote-Jarai Z., Easton D., Whitaker HC., ICGC Prostate UK Group, Neal DE., Cooper CS., Eeles RA., Visakorpi T., Campbell PJ., McDermott U., Wedge DC. and Bova GS. (2015). The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*; 520: 353–357.
- Gupta-Elera G., Garrett AR., Robison RA. and O'Neill KL. (2012). The role of oxidative stress in prostate cancer. *Eur J Cancer Prev.*; 21(2): 155–162.

- Habig WH., Pabst MJ. and Jakoby WB. (1974). Glutathione Stransferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*; 249: 7130–7139.
- Hamid AR., Umbas R. and Mochtar CA. (2011). Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity. *Acta Med Indones.*; 43: 59–65.
- Han HY., Shan S., Zhang X., Wang NL., Lu XP. and Yao XS. (2007). Down-regulation of prostate specific antigen in LNCaP cells by flavonoids from the pollen of *Brassica napus* L. *Phytomedicine.*; 14(5): 338–343.
- Heery D.M., Kalkhoven E., Hoare S. and Parker M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*; 387: 733–736.
- Helsen C., Van den Broeck T., Voet A., Prekovic S., Van Poppel H., Joniau S. and Claessens F. (2014). Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* ; 21(4): T105–T118.
- Hockley SL., Arlt VM., Brewer D., Te Poele R., Workman P., Giddings I. and Phillips DH. (2007). AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem Res Toxicol.*; 20: 1797–1810.
- Hodgson MC., Shen HC., Hollenberg AN. and Balk SP. (2008). Structural basis for nuclear receptor corepressor recruitment by antagonist-liganded androgen receptor. *Mol Cancer Ther.*; 7: 3187–3194.
- Hong MK., Macintyre G., Wedge DC., Van Loo P., Patel K., Lunke S., Alexandrov LB., Sloggett C., Cmero M., Marass F., Tsui D., Mangiola S., Lonie A., Naeem H., Sapre N., Phal PM., Kurganovs N., Chin X., Kerger M., Warren AY., Neal D., Gnanapragasam V., Rosenfeld N., Pedersen JS., Ryan A., Haviv I., Costello AJ., Corcoran NM. and Hovens CM. (2015). Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat Commun.*; 6: 6605.
- Horoszewicz JS., Leong SS., Chu TM., Wajsman ZL., Friedman M., Papsidero L., Kim U., Chai LS., Kakati S., Arya SK. and Sandberg AA. (1980). The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res.*; 37: 115–132.
- Horoszewicz JS., Leong SS., Kawinski E., Karr JP., Rosenthal H., Chu TM., Mirand EA. and Murphy GP. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.*; 43(4): 1809–1818.
- Hu Y., Wang T., Stormo GD. and Gordon JI. (2004). RNA interference of achaete-scute homolog 1 in mouse prostate neuroendocrine cells reveals its gene targets and DNA binding sites. *Proc Nat Acad Sci USA.*; 101(15): 5559–5564.
- Huang S., Zhang C-P., Wang K., Li GQ. and Hu F-L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Mol Basel Switz.*; 19: 19610–19632.
- Huggins C. and Hodges CV. (1941). Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res.*; 1(4): 293–297.
- Huncharek M., Haddock KS., Reid R. and Kupelnick B. (2010). Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *Am J Public Health.*; 100(4): 693–701.
- IARC. (2010). Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 92: pp856.

- IARC. (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs, Volume 100.
- Isaacs JT. and Coffey DS. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl.*; 2: 33–50.
- Ittmann M., Huang J., Radaelli E., Martin P., Signoretti S., Sullivan R., Simons BW., Ward JM., Robinson BD., Chu GC., Loda M., Thomas G., Borowsky A. and Cardiff RD. (2013). Animal Models of Human Prostate Cancer: The Consensus Report of the New York Meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.*; 73(9): 2718–2736.
- Jemal A., Bray F., Center MM., Ferlay J., Ward E. and Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*; 61: 69–90.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T. and Thun MJ. (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.*; 58: 71–96.
- Jessie BC., Sun CQ., Irons HR., Marshall FF., Wallace DC. and Petros JA. (2001). Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages. *Exp Gerontol.*; 37: 169–174.
- Jiao J., Wang S., Qiao R., Vivanco I., Watson PA., Sawyers CL. and Wu H. (2007). Murine cell lines derived from Pten null prostate cancer show the critical role of PTEN in hormone refractory prostate cancer development. *Cancer Res.*; 67(13): 6083–6091.
- Jin B., Turner L., Zhou Z., Zhou EL. and Handelsman DJ. (1999). Ethnicity and migration as determinants of human prostate size. *J Clin Endocrinol Metab.*; 84: 3613–3619.
- Jollow DJ., Mitchell JR., Zampaglione N. and Gillette JR. (1974). Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology*; 11(3): 151–169.
- Kai L. and Levenson AS., 2011. Combination of resveratrol and antiandrogen flutamide has synergistic effect on androgen receptor inhibition in prostate cancer cells. *Anticancer Res.*; 31(10): 3323–3330.
- Kapoor A. (2012). Benign prostatic hyperplasia (BPH) management in the primary care setting. *Can J Urol.*; 19(1): 10–17.
- Kasala ER., Bodduluru LN., Barua CC., Sriram CS. and Gogoi R. (2015). Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacol Rep.*; 67(5): 996–1009.
- Kashani M., Steiner G., Haitel A., Schaufler K., Thalhammer T., Amann G., Kramer G., Marberger M. and Schöller A. (1998). Expression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in fetal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate*; 37(2): 98–108.
- Kawamura Y., Kamata E., Ogawa Y. and Saito Y. (1988). The Effect of Various Foods on the Intestinal-Absorption of Benzo(a)Pyrene in Rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*; 29: 21–25.
- Kellokumpu-Lehtinen PL., Hjalms-Eriksson M., Thellenberg-Karlsson C., Åström L., Franzen L., Marttila T., Seke M., Taalikka M. and Ginman C. (2012). Toxicity in patients receiving adjuvant docetaxel + hormonal treatment after radical radiotherapy for intermediate or high-risk prostate cancer: a preplanned safety report of the SPCG-13 trial. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*; 15: 303–307.

- Kemp CJ. (2015). Animal Models of Chemical Carcinogenesis: Driving Breakthroughs in Cancer Research for 100 Years. *Cold Spring Harb Protoc.*; 2015(10): 865–874.
- Kenfield SA., Stampfer MJ., Chan JM. and Giovannucci E. (2011). Smoking and prostate cancer survival and recurrence. *JAMA.*; 305 (24): 2548–2555.
- Khacha-ananda S., Tragoolpua K., Chantawannakul P. and Tragoolpua Y. (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pac J Cancer Prev.*; 14: 6991–6995.
- Khandrika L., Kumar B., Koul S., Maroni P. and Koul H.K. (2009). Role of Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Cancer Lett.*; 282(2): 125–136.
- Kim J., Koo SI. and Noh SK. (2012). Green tea extract markedly lowers the lymphatic absorption and increases the biliary secretion of ¹⁴C-benzo[a]pyrene in rats. *J Nutr Biochem.*; 23(8):1007–1011.
- Kim KB. and Lee BM. (1997). Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.*; 113: 205–212.
- Kobayashi T., Nakata T. and Kuzumaki T. (2002). Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett.*; 176: 17–23.
- Kojima S., Inahara M., Suzuki H., Ichikawa T. and Furuya Y. (2009). Implications of insulin-like growth factor-I for prostate cancer therapies. *Int J Urol.*; 16(2): 161–167.
- Kollara A. and Brown TJ. (2009). Modulation of aryl hydrocarbon receptor activity by four and a half LIM domain 2. *Int J Biochem Cell Biol.*; 41(5): 1182–1188.
- Kollara A. and Brown TJ. (2010). Four and a half LIM domain 2 alters the impact of aryl hydrocarbon receptor on androgen receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; 118(1-2): 51–58.
- Komoda Y. (1989). Isolation of flavonoids from *Populus nigra* as delta 4-3-ketosteroid (5 alpha) reductase inhibitors. *Chem Pharm Bull.*; 37: 3128–3130.
- Krajewska M., Krajewski S., Epstein JI., Shabaik A., Sauvageot J., Song K., Kitada S. and Reed JC. (1996). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-xL, and mcl-1 expression on prostate cancers. *Am J Pathol.*; 148: 1567–1576.
- Kroemer G., Zamzami N. and Susin SA. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.*; 18(1): 44–51.
- Kryvenko ON. and Epstein J. (2016). Prostate Cancer Grading A Decade After the 2005 Modified Gleason Grading System. *Arch Pathol Lab Med.*; 140:1140–1152.
- Kubina R., Kabala-Dzik A., Dziedzic A., Bielec B., Wojtyczka RD., Bułdak RJ., Wyszynska M., Stawiarska-Pięta B. and Szaflarska-Stojko E. (2015). The Ethanol Extract of Polish Propolis Exhibits Anti-Proliferative and/or Pro-Apoptotic Effect on HCT 116 Colon Cancer and Me45 Malignant Melanoma Cells In Vitro Conditions. *Adv Clin Exp Med.*; 24: 203–212.
- Kyprianou N., Tu H. and Jacobs SC., (1996). Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol.*; 27: 668–675.
- Kypta R.M. and Waxman J. (2012). Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol.*; 9: 418–428.

- Lacorte LM., Delella FK., Amorim EMP., Justulin JR., Godinho AF., Almeida AA., Pinheiro PFF., Amorim RL., and Felisbino SL. (2011). Early Changes Induced by Short-Term Low-Dose Cadmium Exposure in Rat Ventral and Dorsolateral Prostates. *Microsc Res Tech.*; 74: 988–997.
- Lallous N., Dalal K., Cherkasov A. and Rennie PS. (2013). Targeting Alternative Sites on the Androgen Receptor to Treat Castration-Resistant Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.*; 14: 12496–12519.
- Lamb DJ. and Zhang L. (2005). Challenges in Prostate Cancer Research: Animal Models for Nutritional Studies of Chemoprevention and Disease Progression. *J Nutr.*; 135(12): 3009S–3015S.
- Leach DA., Powell SM. and Bevan CL., (2016). Women in cancer tematic review: New roles for nuclear receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.*; 23(11): T85–T108.
- Lee BK., Chung MY. and Lee KW. (2013). Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inhibits gap junction intercellular communication via phosphorylation of tumor progression locus 2 in WB-F344 rat liver epithelial cells. *Mol Carcinog.*; 54(5): 351–358.
- Lee SH., Johnson D., Luong R. and Sun Z. (2015). Crosstalking between androgen and PI3K/AKT signaling pathways in prostate cancer cells. *J Biol Chem.*; 290(5): 2759–2768.
- Legraverend C., Guenther TM. and Nebert DW. (1984). Importance of the route of administration for genetic differences in benzo[a]pyrene-induced in utero toxicity and teratogenicity. *Teratology*; 29: 35–47.
- Lemieux CL., Douglas GR., Gingerich J., Phonethepswath S., Torous DK., Dertinger SD., Phillips DH., Arlt VM. and White PA. (2011). Simultaneous measurement of benzo[a]pyrene-induced Pig-a and lacZ mutations, micronuclei and DNA adducts in Muta Mouse. *Environ Mol Mutagen.*; 52(9): 756–765.
- Lepor H., Kazzazi A. and Djavan B. (2012). α -Blockers for benign prostatic hyperplasia: the new era. *Curr Opin Urol.*; 22(1): 7–15.
- Lesko SM., Rosenberg L. and Shapiro S. (1996). Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol.*; 144: 1041–1047.
- Li F., Awale S., Tezuka Y. and Kadota S. (2010). Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines. *Nat Prod Commun.*; 5(10): 1601–1606.
- Li H., Kapur A., Yang JX., Srivastava S., McLeod DG., Paredes-Guzman JF., Dausch A., Park YK. and Rhim JS. (2007). Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int J Oncol.*; 31: 601–606.
- Lin H-P., Jiang SS. and Chuu C-P. (2012). Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. *PLoS One*; 7: e31286.
- Lin H-P., Lin C-Y., Huo C., Hsiao P-H., Su L-C., Jiang SS., Chan T-M., Chang C-H, Chen L-T., Kung H-J., Wang H-D. and Chuu C-P. (2015). Caffeic acid phenethyl ester induced cell cycle arrest and growth inhibition in androgen-independent prostate cancer cells via regulation of Skp2, p53, p21Cip1 and p27Kip1. *Oncotarget*; 6(9): 6684–6707.
- Lin P., Chang H., Ho WL., Wu MH. and Su JM. (2003). Association of aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P4501B1 expressions in human non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*; 42: 255–261.

- Lin TM., Ko K., Moore RW., Simanainen U., Oberley TD. and Peterson RE. (2002). Effects of aryl hydrocarbon receptor null mutation and in utero and lactational 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci.*; 68: 479–487.
- Lindberg J., Klevebring D., Liu W., Neiman M., Xu J., Wiklund P., Wiklund F., Mills IG., Egevad L. and Grönberg H. (2013). Exome sequencing of prostate cancer supports the hypothesis of independent tumour origins. *Eur Urol.*; 63: 347–353.
- Lobaccaro JM. and Sultan C. (1992). Normal sexual differentiation: molecular genetic and endocrinology. *C R Seances Soc Biol Fil.*; 186(4): 314–331.
- Loeb S., Kettermann A., Carter HB., Ferrucci L., Metter EJ. and Walsh PC. (2009). Prostate volume changes over time: Results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Urol.*; 182: 1458–1462.
- Lohnes D., Kastner P., Dierich A., Mark M., LeMeur M. and Chambon P. (1993). Function of retinoic acid receptor γ in the mouse. *Cell*; 73(4): 643–658.
- Lonergan PE. and Tindall DJ. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog.*; 10: 20.
- Lonn E., Bosch J., Yusuf S., Sheridan P., Pogue J., Arnold JMO., Sleight P., Probstfield J. and Dagenais GR. (2005). Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.*; 293: 1338–1347.
- Lucey BP., Nelson-Rees WA. and Hutchins GM. (2009). Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med.*; 133: 1463–1467.
- Luzzi G. (2010). Prostatitis and male chronic pelvic pain. *Medicine*; 38(6): 314–317.
- Machado BAS., Silva RPD., Barreto G de A., Costa SS., Silva DF., da Brandão HN., Rocha JLC., da Dellagostin OA., Henriques JAP., Umsza-Guez MA. and Padilha FF. (2016). Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One*; 11: e0145954.
- Madhavan ND. and Naidu KA. (2000). Purification and partial characterization of peroxidase from human term placenta of non-smokers: Metabolism of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol. *Placenta.*; 21: 501–509.
- Mangal D., Vudathala D., Park JH. Lee SH., Penning TM. and Blair IA. (2009). Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chem Res Toxicol.*; 22 (5): 788–797.
- Mao GE., Morris G., Lu QY., Cao W., Reuter VE., Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Scher HI., deKernion JB. and Zhang ZF. (2004). Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism, cigarette smoking and prostate cancer. *Cancer Detect Prev.*; 28: 368–374.
- Mass MJ., Jeffers AJ., Ross JA., Nelson G., Galati AJ., Stoner GD. and Nesnow S. (1993). K-ras oncogene mutations in tumors and DNA adducts formed by benz[a]aceanthrylene and benzo[a]pyrene in the lungs of strain A/J mice. *Mol Carcinog.*; 8(3): 186–192.
- McEleny K., Coffey R., Morrissey C., Fitzpatrick JM. and Watson RWG. (2004). Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int.*; 94: 402–406.

- McKinnon RA., Sorich MJ. and Ward MB. (2008). Cytochrome P450 Part 1: Multiplicity and Function. *J Pharm Pract Res.*; 38(1): 55–57.
- McNeal JE. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The prostate*; 2(1): 35–49.
- McNeal JE. (1984). Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res.*; 145: 27–53.
- McNeal JE. (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.*; 12(8): 619–633.
- Mehraein-Ghomi F., Lee E., Church DR., Thompson TA., Basu HS. and Wilding G. (2008). JunD mediates androgen-induced oxidative stress in androgen dependent LNCaP human prostate cancer cells. *Prostate*; 68: 924–934.
- Melendez-Colon VJ., Luch A., Seidel A. and Baird WM. (1999). Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis*; 20: 1885–1891.
- Memarzadeh S., Cai H., Janzen DM., Xin L., Lukacs R., Riedinger M., Zong Y., DeGendt K., Verhoeven G., Huang J. and Witte ON. (2011). Role of autonomous androgen receptor signaling in prostate cancer initiation is dichotomous and depends on the oncogenic signal. *PNAS.*; 108: 7962–7967.
- Miguel MG., Nunes S., Dandlen SA., Cavaco AM. and Antunes M.D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem Toxicol.*; 48: 3418–3423.
- Miller DC., Hafez KS., Stewart A., Montie JE. and Wei JT. (2003). Prostate carcinoma presentation, diagnosis and staging: an update from the National Cancer Data Base. *Cancer*; 98(6): 1169–1178.
- Minciullo PL., Inferrera A., Navarra M., Calapai G., Magno C. and Gangemi S. (2015). Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *Urol Int.*; 94(3): 249–54.
- Mitsui Y., Chang I., Kato T., Hashimoto Y., Yamamura S., Fukuhara S., Wong D.K., Shiina M., Imai-Sumida M., Majid S., Saini S., Shiina H., Nakajima K., Deng G., Dahiya R. and Tanaka Y. (2016). Functional role and tobacco smoking effects on methylation of CYP1A1 gene in prostate cancer. *Oncotarget*; 7(31): 49107–49121.
- Mittal RD., Kesarwani P., Singh R., Ahirwar D. and Mandhani A. (2009). GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene variants and risk of benign prostate hyperplasia in North India. *Dis Markers.*; 26: 85–91.
- Modica R., Fiume M., Guaitani A. and Bartosek I. (1983). Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. *Toxicol Lett.*; 18: 103–109.
- Moir D., Viau A., Chu I., Withey J. and McMullen E. (1998). Pharmacokinetics of benzo[a]pyrene in the rat. *J Toxicol Environ Health A.*; 53(7): 507–530.
- Moraes CS., Dausch A., Li H., Rhim JS. and Park YK. (2010). Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. *Ciênc Tecnol Aliment.*; 30(2): 539–543.
- Muli EM. and Maingi JM. (2007). Antibacterial activity of Apis mellifera L. propolis collected in three regions of Kenya. *J Venom Anim Toxins Trop Dis.*; 655–663.

- Mundle SD., Gregory SA., Preislert HD. and Raza A. (1996). Enzymatic programming of apoptotic cell death. *Pathobiol.*; 64: 161–170.
- Murray IA., Patterson AD. and Perdew GH. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer.*; 14: 801–814.
- Mustafa M., Salih AF., Illzam EM., Sharifa AM., Suleiman M. and Hussain SS. (2016). Prostate Cancer: Pathophysiology, Diagnosis, and Prognosis. *IOSR-JDMS.*; 15(6): 4–11.
- Nagle RB., Ahmann FR., McDaniel KM., Paquin ML., Clark VA., and Celniker A. (1987). Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res.*; 47: 281–286.
- Nair HK., Rao KVK., Aalinkeel R., Mahajan S., Chawda R. and Schwartz SA. (2004). Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol.*; 11: 63–69.
- Nam, J.-S., Sharma, A.R., Nguyen, L.T., Chakraborty, C., Sharma, G., and Lee, S.-S. (2016). Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine. *Mol Basel Switz.*; 21: E108.
- Nelson WG., de Marzo AM., deWeese TL. and Isaacs WB. (2004). The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol.*; 172: S6–S11.
- Nerurkar PV., Schut HA., Anderson LM., Riggs CW., Fornwald LW. and Davis CD. (1996). Ahr locus phenotype in congenic mice influences hepatic and pulmonary DNA adduct levels of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the absence of cytochrome P450 induction. *Mol Pharmacol.*; 49: 874–881.
- Neto AS., Tobias-Machado M., Wroclawski ML., Fonseca FL., Pompeo AC. and Del Giglio A. (2010). Molecular oncogenesis of prostate adenocarcinoma: role of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu). *Tumori*; 96 (5): 645–649.
- Newman DJ. and Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.*; 70(3): 461-477.
- Nickel JC. (2011). Prostatitis. *Can Urol Assoc J.*; 5(5): 306–315.
- Noori S. (2012). An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Sci Rep.*; 1(8): 1–9.
- Oh B., Figtree G., Costa D., Eade T., Hruby G., Lim S., Elfiky A., Martine N., Rosenthal D., Clarke S., and Back M. (2016). Oxidative stress in prostate cancer patients: A systematic review of case control studies. *Prostate Int.*; 4(3): 71–87.
- Okey AB. (2007). An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI. *Toxicol Sci.*; 98: 5–38.
- Okhawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem.*; 95: 351–358.
- Olinski R., Zastawny TH., Foksinski M., Barecki A. and Dizdaroglu M. (1995). DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. *Free Radic Biol Med.*; 18: 807–813.

- Oliveira ACP., Shinobu CS., Longhini R., Franco SL. and Svidzinski T.IE. (2006). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 101: 493–497.
- Orsatti CL., Missima F., Pagliarone AC., Bachiega TF., Búfalo MC., Araújo JP. and Sforcin JM. (2010). Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res.*; 24: 1141–1146.
- Orsolić N., Knezević AH., Sver L., Terzić S. and Basić I. (2004). Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol.*; 94: 307–315.
- Osborne MR. and Crosby NT. (1987). Benzopyrenes. Cambridge Monographs on Cancer Research. Cambridge University Press. pp352.
- Ouyang B., Baxter C.S., Lam H-M., Yeramani S., Levin L., Haynes E. and Ho S-m. (2012). Hypomethylation of dual specificity phosphatase 22 promoter correlates with duration of service in firefighters and is inducible by low-dose benzo[a]pyrene. *J Occup Environ Med.*; 54(7): 774–780.
- Ouyang X., DeWeese TL., Nelson WG. and Abate-Shen C. (2005). Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. *Cancer Res.*; 65: 6773–6779.
- Parent MÉ., Désy M., and Siemiatycki J. (2009). Does Exposure to Agricultural Chemicals Increase the Risk of Prostate Cancer among Farmers? *Mcgill J Med.*; 12(1): 70–77.
- Park YK., Fukuda I., Ashida H., Nishiumi S., Guzman JP., Sato HH. and Pastore GM. (2003). Suppression of dioxine mediated aryl hydrocarbon receptor transformation by ethanolic extracts of propolis. *Biosci Biotechnol Biochem.*; 68(4): 935–938.
- Pellati F., Orlandini G., Pinetti D. and Benvenuti S. (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *J Pharm Biomed Anal.*; 55(5): 934-948.
- Patel ND. and Parsons JK. (2014). Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *Indian J Urol.*; 30(2): 170–176.
- Patel S. (2016). Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. *J Diet Suppl.*; 13: 245–268.
- Penning TM., Burczynski ME., Hung CF. McCoull KD., Palackal NT. and Tsuruda LS. (1999). Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol.*; 12 (1): 1–18.
- Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF. and Wallace DC. (2005). mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci.*; 102: 719–724.
- Petrulis JR., Kusnadi A., Ramadoss P., Hollingshead B. and Perdew GH. (2003). The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem.*; 278: 2677–2685.
- Phillips DH. and Grover PL. (1994). Polycyclic hydrocarbon activation: bay regions and beyond. *Drug Metab Rev.*; 26: 443–467.
- Pratt WB. and Toft DO. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.*; 18: 306–360.

- Price D. (1963). Comparative Aspects of Development and Structure in the Prostate. *Natl Cancer Inst Monogr.*; 12: 1–27.
- Qu SX. and Stacey NH. (1996). Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*; 17(1): 53–59.
- Rahman MM., Richardson A. and Sofian-Azirun M. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Afr J Microbiol Res.*; 4(18): 1872–1878.
- Ramesh A., inyang F., Hood DB., Archibong AE., Knuckles ME., and Nyanda AM. (2001). Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of Benzo(a)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp Toxic Pathol.*; 53: 275–290.
- Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed JC. and Perucho M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*; 275 : 967–969.
- Rea D., del Vecchio V., Palma G., Barbieri A., Falco M., Luciano A., De Biase D., Perdonà S., Facchini G. and Arra C. (2016). Mouse Models in Prostate Cancer Translational Research: From Xenograft to PDX. *Biomed Res Int.*; 2016: 9750795.
- Rengarajan T., Rajendran P., Nandakumar N., Lokeshkumar B., Rajendran P. and Nishigaki I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pac J Trop Biomed.*; 5(3): 182–189.
- Revel A., Raanani H., Younglai E., Xu J., Rogers I., Han R., Savouret JF. and Casper RF. (2003). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J Appl Toxicol.*; 23: 255–261.
- Reynolds MA., 2008. Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett.*; 271(1): 13–24.
- Rieken M, Shariat SF, Kluth LA, Fajkovic H, Rink M, Karakiewicz PI, Seitz C, Briganti A, Roupret M, Loidl W, Trinh QD, Bachmann A, Pourmand G. (2015). Association of Cigarette Smoking and Smoking Cessation with Biochemical Recurrence of Prostate Cancer in Patients Treated with Radical Prostatectomy. *Eur Urol.*; 68: 949–956.
- Rizk SM., Zaki HF. and Mina MAM. (2014). Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem Toxicol.*; 67: 176–186.
- Robinson D., Van Allen EM., Wu YM., Schultz N., Lonigro RJ., Mosquera JM., Montgomery B., Taplin ME., Pritchard CC., Attard G., Beltran H., Abida W., Bradley RK., Vinson J., Cao X., Vats P., Kunju LP., Hussain M., Feng FY., Tomlins SA., Cooney KA., Smith DC., Brennan C., Siddiqui J., Mehra R., Chen Y., Rathkopf DE., Morris MJ., Solomon SB., Durack JC., Reuter VE., Gopalan A., Gao J., Loda M., Lis RT., Bowden M., Balk SP., Gaviola G., Sougnez C., Gupta M., Yu EY., Mostaghel EA., Cheng HH., Mulcahy H., True LD., Plymate SR., Dvinge H., Ferraldeschi R., Flohr P., Miranda S., Zafeiriou Z., Tunariu N., Mateo J., Perez-Lopez R., Demichelis F., Robinson BD., Schiffman M., Nanus DM., Tagawa ST., Sigaras A., Eng KW., Elemento O., Sboner A., Heath EI., Scher HI., Pienta KJ., Kantoff P., de Bono JS., Rubin MA., Nelson PS., Garraway LA., Sawyers CL. and Chinnaiyan AM. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*; 161: 1215–1228.
- Roby KF., (2014). Endocrine disruptors, in: Hoyer P.B. (2014). Ovarian Toxicology, second edition. *CRC Press*: 153–169.

- Rohrmann S., Linseisen J., Allen N., Bueno-de-Mesquita HB., Johnsen NF., Tjønneland A., Overvad K., Kaaks R., Teucher B., Boeing H., Pischon T., Lagiou P., Trichopoulou A., Palli D., Krogh V., Tumino R., Ricceri F., Argüelles Suárez M.V., Agudo A., Sánchez MJ., Chirlaque M.D, Barricarte A., Larrañaga N., Boshuizen H., van Kranen H.J., Stattin P., Johansson M., Bjartell A., Ulmert D., Khaw K.T., Wareham N.J., Ferrari P., Romieu I., Gunter MJR., Riboli E., and Key TJ. (2013). Smoking and the risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer.*; 108: 708–714.
- Rosenberg Zand RS., Jenkins DJA. and Diamandis EP. (2002). Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*; 777: 219–232.
- Ross J., Nelson G., Kligerman A., Erexson G., Bryant M., Earley K., Gupta R. and Nesnow S. (1990). Formation and persistence of novel benzo(a)pyrene adducts in rat lung, liver, and peripheral blood lymphocyte DNA. *Cancer Res.*; 50(16): 5088–5094.
- Ruijter ET., van de Kaa CA., Schalken JA., Debruyne FM. and Ruiter DJ. (1996). Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. Biological and clinical implications. *J Pathol.*; 180: 295–299.
- Russo A., Cardile V., Sanchez F., Troncoso N., Vanella A. and Garbarino JA. (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci.*; 76(5): 545–558.
- Rybicki BA., Neslund-Dudas C., Nock NL., Schultz LR., Eklund L., Rosbolt J., Bock CH., and Monaghan KG. (2006). Prostate cancer risk from occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons interacting with the GSTP1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Detect Prev.*; 30(5): 412–422.
- Sadikovic B. and Rodenhiser DI. (2006). Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.*; 216: 458–468.
- Safe S., Lee SO. and Jin UH. (2013). Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Carcinogenesis and Potential as a Drug Target. *Toxicol Sci.*; 135(1): 1–16.
- Salemi M., Condorelli RA., La Vignera S., Barone N., Ridolfo F., Giuffrida MC., Vicari E. and Calogero AE. (2014). PARP-1 and CASP3 genes are up-regulated in LNCaP and PC-3 prostate cancer cell lines. *Human Cell*; 27: 172–175.
- Salim EI., Abd El-Magid AD., Farara KM. and Maria D.SM. (2015). Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis Against the PC3 Prostate Cancer Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev.*; 16(17): 7641–7651.
- Samarghandian S., Afshari JT. and Davoodi S. (2011). Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. *Clin Sao Paulo Braz.*; 66: 1073–1079.
- Sampietro DA., Sampietro Vattuone MM. and Vattuone MA. (2016). Immunomodulatory activity of *Apis mellifera* propolis from the North of Argentina. *LWT - Food Sci Technol.*; 70: 9–15.
- Sanda MG., Beaty TH., Stutzman RE., Childs B. and Walsh PC. (1994). Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.*; 152: 115–119.
- Sanderson JT., Hordijk J., Denison MS., Springsteel MF., Nantz MH. and van den Berg M. (2004). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci.*; 82: 70–79.
- Savas M. (2012). Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. In: Studies on Men's Health and Fertility. Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG (eds). *Humana Press, New York*, pp 672.

- Sawada N., Inoue M., Iwasaki M., Sasazuki S., Yamaji T., Shimazu T. and Tsugane S. (2013). Alcohol and smoking and subsequent risk of prostate cancer in Japanese men: The Japan Public Health Center-based prospective study. *Int J Cancer.*, 134: 971–978.
- Schnekenburger M., Peng L. and Puga A. (2007). HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated trans-activation. *Biochim Biophys Acta.*; 1769: 569–578.
- Schröder FH., Hugosson J., Roobol MJ., Tammela TLJ., Ciatto S., Nelen V., Kwiatkowski M., Lujan M., Lilja H., Zappa M., Denis L.J., Recker F., Berenguer A., Määttänen L., Bangma C.H., Aus G., Villers A., Rebillard X., van der Kwast T., Blijenberg B.G., Moss S.M., de Koning H.J. and Auvinen A. (2009). Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med.*; 360: 1320–1328.
- Sciarra A., Di Silverio F., Salciccia S., Autran Gomez AM., Gentilucci A. and Gentile V. (2007). Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *Eur Urol.*; 52: 964–972.
- Segueni N., Magid AA., Decarme M., Rhouati S., Lahouel M., Antonicelli F., Lavaud C. and Hornebeck W. (2011). Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from Algeria. *Planta Med.*; 77: 999–1004.
- Sen S., Bhojnarwala P., Francey L., Lu D., and Penning Jeffrey Field TM. (2012). p53 Mutagenesis by Benzo[a]pyrene derived Radical Cations. *Chem Res Toxicol.*; 25(10): 2117–2126.
- Serefoglu EC., Altinova S., Ugras NS., Akincioglu E., Asil E., and Balbay MD. (2013). How reliable is 12-core prostate biopsy procedure in the detection of prostate cancer? *Can Urol Assoc J.*; 7(5-6): E293–E298.
- Sforcin JM, Bankova V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.*; 133(2): 253–260.
- Sforcin JM. (2007). Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol.*; 113: 1–14.
- Sforcin JM. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res.*; 30: 894–905.
- Shafi AA., Yen AE. and Weigel NL. (2013). Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Therap.*; 140: 223–238.
- Shariat SF., Shalev M., Menesses-Diaz A., Kim IY., Kattan MW., Wheeler TM. and Slawin KM. (2001). Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta (1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol.*; 19 (11): 2856–2864.
- Sharma M., Chuang W.W. and Sun Z. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation. *J Biol Chem.* ; 277(34): 30935–30941.
- Sheehan D., Meade G., Foley VM. and Dowd CA. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.*; 360(1): 1–16.
- Shen K-H., Hung S-H., Yin L-T., Huang C-S., Chao C-H., Liu C-L. and Shih Y-W. (2010). Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem.*; 333: 279–291.

- Shen MM. and Abate-Shen C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.*; 24: 1967–2000.
- Shimada T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.*; 21(4): 257–276.
- Shimizu Y., Nakatsuru Y., Ichinose M. Takahashi Y., Kume H., Mimura J., Fujii-Kuriyama Y. and Ishikawa T. (2000). Benzo[a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *PNAS.*; 97 (2): 779–782.
- Shum S., Jensen NM. and Nebert DW. (1979). The murine Ah locus: in utero toxicity and teratogenesis associated with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism. *Teratology*; 20: 365–376.
- Silva BB., Rosalen PL., Cury JA., Ikegaki M., Souza VC., Esteves A. and Alencar SM. (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid-Based Complement Altern Med.*; 5: 313–316.
- Simoncini T. and Genazzani AR. (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol.*; 148(3): 281–292.
- Simone-Finstrom M. and Spivak M., (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*; 41 (3) : 295–311.
- Simpson RJ. (1997). Benign prostate hyperplasia. *Br J Gen Pract.*; 47: 235–240.
- Singh SM., Gauthier S. and Labrie F. (2000). Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr Med Chem.*; 7: 211–247.
- Sinha R., Park Y., Graubard BI., Leitzmann MF., Hollenbeck A., Schatzkin A. and Cross AJ. (2009). Meat and Meat-related Compounds and Risk of Prostate Cancer in a Large Prospective Cohort Study in the United States. *Am J Epidemiol.*; 170(9): 1165–1177.
- Sobel RE. and Sadar MD. (2005). Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines-Part 2. *J Urol.*; 173: 360–372.
- Soda M., Hu D., Endo S., Takemura M., Li J., Wada R., Ifuku S., Zhao H-T., El-Kabbani O., Ohta S., Yamamura K., Toyooka N., Hara A., Matsunaga T. (2012). Design, synthesis and evaluation of caffeic acid phenethyl ester-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human aldo-keto reductase 1B10. *Eur J Med Chem.*; 48: 321–329.
- Sparnins VL., Mott AW., Barany G. and Wattenberg LW. (1986). Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse. *Nutr Cancer*; 8: 211–215.
- Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa JL., Brothers GM., Mirtsos C., Sasaki T. and Ruland J. (1998). Negative regulation of PKB/ Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*; 95: 29–39.
- Sterling KM. and Cutroneo KR. (2004). Constitutive and inducible expression of cytochromes P4501A (CYP1A1 and CYP1A2) in normal prostate and prostate cancer cells. *J Cell Biochem.*; 91(2): 423–429.
- Strand DW. and Goldstein AS. (2015). The many ways to make a luminal cell and a prostate cancer cell. *Endocr Relat Cancer.*; 22(6): 187–197.

- Su T. and Waxman DJ. (2004). Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.*; 424(2): 226–234.
- Sugimura Y., Cunha GR. and Donjacour AA. (1986). Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod.*; 34(5): 961–971.
- Suh J., Payvandi F., Edelstein LC., Amenta PS., Zong WX., Gélinas C. and Rabson AB. (2002). Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate*; 52(3): 183–200.
- Szliszka E., Czuba ZP., Bronikowska J., Mertas A., Paradysz A. and Krol W. (2011a). Ethanolic Extract of Propolis Augments TRAIL-Induced Apoptotic Death in Prostate Cancer Cells. *Evid-Based Complement Altern Med.*; 2011: 535172.
- Szliszka E., Czuba ZP., Bronikowska J., Mertas A., Paradysz A. and Krol W. (2009). Ethanolic Extract of Propolis Augments TRAIL-Induced Apoptotic Death in Prostate Cancer Cells. *Evid-Based Complement Altern Med.*; 2011, ID 535172, pp11.
- Szliszka E., Zydowicz G., Janoszka B., Dobosz C., Kowalczyk-Ziomek G. and Krol W. (2011b). Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol.*; 38: 941–953.
- Tam NN., Gao Y., Leung YK. and Ho SM. (2003). Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. *Am J Pathol.*; 163: 2513–2522.
- Tan MH., Li J., Xu HE., Melcher K. and Yong EL. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.*; 36(1): 3–23.
- Tang DG. and Porter AT. (1997). Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. *Prostate*; 32(4): 284–293.
- Tekpli X., Rivedal E., Gorria M., Landvik NE., Rissel M., Dimanche-Boitrel MT., Baffet G., Holme JA. and Lagadic-Gossman D. (2010). The B[a]P-increased intercellular communication via translocation of connexin-43 into gap junctions reduces apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.*; 242: 231–240.
- Tekpli X., Zienolddiny S., Skaug V., Stangeland L., Haugen A. and Mollerup S. (2012). DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer.*; 131: 1509–1516.
- Tenke P., Horti J., Balint P. and Kovacs B. (2007). Prostate cancer screening, In: Prostate cancer. *Springer Berlin Heidelberg*: 65–81.
- Thapa D. and Ghosh R. (2012). Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: Challenges and opportunities. *Biochem Pharmacol.*; 83: 1319–1330.
- Thielen JL., Volzing KG., Collier LS., Green LE., Largaespada DA. and Marker PC. (2007). Markers of prostate region-specific epithelial identity define anatomical locations in the mouse prostate that are molecularly similar to human prostate cancers. *Differentiation*; 75: 49–61.
- Thompson TC. and Yang G. (2000). Regulation of apoptosis in prostatic disease. *Prostate Suppl.*; 9: 25–28.

- Thyssen J., Althoff J., Kimmerle G. and Mohr U. (1981). Inhalation studies with benzo[a]pyrene in Syrian golden hamsters. *J Natl Cancer Inst.*; 66(3): 575–577.
- Tran C., Richmond O., Aaron L. and Powell JB. (2013). Inhibition of constitutive aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling attenuates androgen independent signaling and growth in (C4-2) prostate cancer cells. *Biochem Pharmacol.*; 85: 753–762.
- Trivedi R. and Mishra DP, (2015). Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells. *Front Oncol.*; 5: 69.
- Turan I., Demir S., Misir S., Kilinc K., Mentese A., Aliyazicioglu Y. and Deger O. (2015). Cytotoxic Effect of Turkish Propolis on Liver, Colon, Breast, Cervix and Prostate Cancer Cell Lines. *Trop J Pharm Res.*; 14(5): 777–782.
- Udensi U.K. and Tchounwou P.B. (2016). Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.*; 35(1):139.
- Valente MJ., Baltazar AF., Henrique R., Estevinho L. and Carvalho M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food Chem Toxicol.* ; 49: 86–92.
- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.*; 160: 1–40.
- Van Der Cruijssen-Koeter IW., Vis AN., Roobol MJ., Wildhagen MF., De Koning HJ., Van Der Kwast TH. and Schröder FH. (2005). Comparison of screen detected and clinically diagnosed prostate cancer in the European randomized study of screening for prostate cancer. *J Urol.*; 174(1): 121–125.
- van Royen ME., van Cappellen WA., de Vos C., Houtsmuller AB. and Trapman J. (2012). Stepwise androgen receptor dimerization. *J Cell Sci.*; 125: 1970–1979.
- Veldscholte J., Ris-Stalpers C., Kuiper GG., Jenster G., Berrevoets C., Claassen E., van Rooij HC., Trapman J., Brinkmann AO. and Mulder E. (1990). A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun.*; 173(2): 534–540.
- Verze P., Cai T. and Lorenzetti S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol.*; 13(7): 379–386.
- Vogel CF.A. and Haarmann-Stemmann T. (2017). The aryl hydrocarbon receptor repressor – More than a simple feedback inhibitor of AhR signaling: Clues for its role in inflammation and cancer. *Curr Opin Toxicol.*; 2: 109–119.
- Wagenlehner FM.E. and Naber KG. (2006). Current challenges in the treatment of complicated urinary tract infections and prostatitis. *Clin Microbiol Infect.*; 12(3): 67–80.
- Wang Y., Cui R., Xiao Y., Fang J. and Xu Q. (2015). Effect of carotene and lycopene on the risk of prostate cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *PLoS One.*; 10(9): e0137427.
- Watanabe MAE., Amarante MK., Conti BJ. and Sforcin JM. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol.*; 63: 1378–1386.

- Wester PW., Muller JJA., Slob W., Mohn GR., Dortant PM. and Kroese ED. (2012). Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.*; 50(3–4): 927–935.
- Weyand EH. and Bevan DR. (1986). Benzo(a)pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer Res.*; 46: 5655–5661.
- Williams AM., Simon I., Landis PK., Moser C., Christens-Barry W., Carter HB., Metter EJ. and Partin AW. (1999). Prostatic growth rate determined from MRI data: Age-related longitudinal changes. *J Androl.*; 20: 474–480.
- Wong CP., Bray TM. and Ho E. (2009). Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. *Cancer Lett.*; 276: 38–46.
- Wu D. and Cederbaum AI. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.*; 27(4): 277–284.
- Xiao W., Hodge DR., Wang L., Yang X., Zhang X. and Farrar WL. (2004). Co-operative functions between nuclear factors NFkappaB and CCAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBP-beta) regulate the IL-6 promoter in autocrine human prostate cancer cells. *Prostate*; 61(4): 354–370.
- Xing N., Chen Y., Mitchell SH. and Young CY. (2001). Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis.*; 22(3): 409–414.
- Xu C., Chen J., Qiu Z., Zhao Q., Luo J., Yang L., Zeng H., Huang Y., Zhang L., Cao J. and Shu W. (2010). Ovotoxicity and PPAR-mediated aromatase downregulation in female Sprague-Dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Lett.*; 199: 323–332.
- Xu J., Wu RC. and O'Malley BW. (2009). Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer.*; 9: 615–630.
- Xue W. and Warshawsky D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol.*; 206: 73–93.
- Yamashita M., Zhang X., Shiraishi T., Uetsuki H. and Kakehi Y. (2003). Determination of percent area density of epithelial and stromal components in development of prostatic hyperplasia in spontaneously hypertensive rats. *Urology*; 61: 484–489.
- Yang CC., Sun SS., Lin CY., Chuang FJ. and Kao CH. (2003). Differentiation of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: the clinical value of 201Tl SPECT—a pilot study. *Ann Nucl Med.*; 17(7): 521–524.
- Yang Y., Rafter J., Gustafsson JA., Sjövall J. and Griffiths WJ. (1998). Analysis of the major mercapturic acid pathway metabolites of benzo[a]pyrene found in rat urine by nano-electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*; 12(8): 465–471.
- Yardy GW. and Brewster SF. (2005). Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*; 8(2): 119–126.
- Yuan H., Gong A. and Young CY. (2005). Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*; 26(4): 793–801.

- Zabaiou N., Fouache A., Trousson A., Baron S., Zellagui A., Lahouel M. and Lobaccaro J-MA., (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids xxx ; xxx-xxx*.
- Zabaiou N., Mabed D., Lobaccaro J.M. and Lahouel M. (2015). Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. *Andrologia; 48 (1): 69–73*.
- Zapata DF., Howard LE., Aronson WJ., Kane CJ., Terris MK., Amling CL., Cooperberg MR. and Freedland SJ. (2015). Smoking is a predictor of adverse pathological features at radical prostatectomy: Results from the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital database. *Int J Urol.; 22: 658–662*.
- Zhang E-H., Wang R-F., Guo S-Z. and Liu B. (2013a). An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. *Evid-Based Complement Altern Med.; 2013: 815621*.
- Zhang L., Huang M., Blair IA. and Penning TM. (2012a). Detoxication of benzo[a]pyrene-7,8-dione by sulfotransferases (SULTs) in human lung cells. *J Biol Chem.; 287(35): 29909–29920*.
- Zhang L., Jin Y., Huang M. and Penning T.M. (2012b). The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones. *Front Pharmacol.; 3(193): 1–12*.
- Zhang W., Lan Y., Huang Q. and Hua Z. (2013b). Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK. *Cytotechnology; 65: 447–455*.
- Zhang W., Tang B., Huang Q. and Hua Z. (2013c). Galangin inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma. *J Cell Biochem.; 114: 152–161*.
- Zhong WD., Peng J., He HC., Wu D., Han ZD., Bi XC. and Dai Q. (2008). Ki-67 and PCNA expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Invest Med.; 31(1): E08–E15*.
- Zhou Y., Bolton EC. and Jones JO. (2015). Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. *J Mol Endocrinol.; 54(1): 15–29*.
- Zhu M. and Fahl WE. (2001). Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochem Biophys Res Commun.; 289: 212–219*.
- Zhu ML., Horbinski CM., Garzotto M., Qian DZ., Beer TM. and Kyprianou N. (2010). Tubulin-targeting chemotherapy impairs androgen receptor activity in prostate cancer. *Cancer Res.; 70: 7992–8002*.

Nada ZABAIYOU

Etude du stress oxydatif dans l'hypertrophie bénigne de la prostate et mise en évidence de l'effet de la propolis contre le cancer de la prostate in vivo sur un modèle animal de rat Wistar et ex vivo sur les cellules LNCaP du cancer de la prostate hormono-sensibles.

Résumé

L'HBP et le cancer de la prostate constituent les deux maladies prostatiques les plus répandues chez l'homme âgé. La compréhension de leur étiologie et de leur pathogenèse est nécessaire afin de permettre la prévention mais aussi la recherche et le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

Notre but est d'étudier l'implication du stress oxydatif dans l'HBP et d'étudier l'effet de l'extrait de propolis sur le cancer de la prostate *in vivo* chez le rat Wistar et *in vitro* sur les cellules LNCaP.

Nous avons montré que : 1) Le stress oxydatif joue le rôle de promoteur dans le développement de l'HBP, 2) Le benzo(a)pyrène administré aux rats Wistar induit le développement du cancer de la prostate, 3) La propolis induit la diminution de la prolifération, de l'expression du Ki-67 (-49 %) et de l'expression de AhR chez le rat Wistar, 4) La propolis possède un effet antiprolifératif sur les cellules LNCaP via le blocage de la signalisation de AR.

Mots clés : HBP- Cancer de la prostate- Rat Wistar- Stress oxydatif- Benzo(a)pyrène- LNCaP- Propolis.

Abstract

BPH and prostate cancer are the two most prevalent prostatic diseases in elders. Understanding their etiology and pathogenesis is necessary in order to prevent them and to enhance both research and development of new therapeutic agents.

Our goal is to study the implication of oxidative stress in BPH and to study the effect of propolis extract on prostate cancer *in vivo* in Wistar rats and *in vitro* on LNCaP cells.

We have shown that: 1) Oxidative stress acts as a promoter in the development of BPH, 2) Benzo(a)pyrene administered to Wistar rats induces the development of prostate cancer, 3) Propolis induces a decrease in proliferation, Ki-67 expression (-49%) and AhR expression in the Wistar rat, (4) Propolis has an antiproliferative effect on LNCaP cells via AR signaling blockade.

Key words: HBP- Prostate Cancer- Wistar rat- Oxidative stress- Benzo(a)pyrene- LNCaP- Propolis.

ملخص

تضخم البروستات الحميد وسرطان البروستات يعتبران من أكثر الامراض شيوعا عند الرجال المتقدمين في السن. فهم سبب وكيفية حدوث المرضين يعتبر أمر ضروري من أجل الوقاية من جهة والتمكّن من اكتشاف وتطوير أدوية جديدة أكثر فعالية من جهة أخرى.

هدفنا هو دراسة الاجهاد التأكسدي كعامل في تطور مرض تضخم البروستات الحميد ودراسة تأثير البروبوليس على سرطان البروستات عند فئران ويستار وكذلك على الخلايا السرطانية من نوع LNCaP.

لقد أثبتنا من خلال هذه الدراسة أن (1) الاجهاد التأكسدي يلعب دورا في تطور مرض تضخم البروستات الحميد (2) حقن الفئران بالبنزوبيران يؤدي الى ظهور وتطور سرطان البروستات (3) البروبوليس تؤدي الى خفض وتيرة التكاثر الخلوي, خفض عدد Ki-67 بنسبة 49 % وكذلك خفض AhR عند فئران ويستار (4) تمتلك البروبوليس القدرة على خفض الانقسام والتكاثر الخلويين لخلايا LNCaP عن طريق حجب وتنشيط طريق الاندروجينات.

الكلمات المفتاحية : تضخم البروستات الحميد- سرطان البروستات- فئران ويستار- الاجهاد التأكسدي- البنزوبيران- LNCaP- البروبوليس.